

"مقاله پژوهشی"

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

سیدعبدالحمید حسینی^{۱*}، پرینا کوچنین^۲، مجتبی علیشاهی^۳، نکاور محمدیان^۳، محمد ذاکری^۲

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

چکیده

استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبرزی پروری به دلیل اثرات مفید در سلامت ماهی رشد فرآیندهای ایمنی داشته است. یکی از مشکلات اصلی استفاده از پروبیوتیک‌ها غیرفعال شدن آنها در شرایط معدی - روده ای ماهی است، محافظت پروبیوتیک‌ها با پوشش‌های فیزیکی توان پروبیوتیکی آنها را بهبود می‌بخشد. لذا در این تحقیق اثر باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی $25/53 \pm 0/82$ گرم به چهار تیمار لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی، آلژینات همراه با کیتوزان بدون حضور لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس به تنهایی و شاهد بدون افزودنی پروبیوتیکی تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شده و پس از اتمام دوره آزمایش، تیمارها به مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک‌های غذایی شدند. نمونه‌گیری از ماهیان در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ تحقیق انجام و برخی فاکتورهای ایمنی از جمله لایزوزیم سرم، میزان فعالیت کمپلمان، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و قدرت احیاء اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از افزایش میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش نسبت به سایر تیمارها بود. همچنین بیشترین میزان پروتئین کل و گلوبولین در روز ۳۰ آزمایش در تیمارهای ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی و آلژینات/کیتوزان نسبت به سایر تیمارها و در روز ۶۰ آزمایش نیز این مقادیر در تیمارهای مذکور نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به روش امولسیون داخلی باعث بهبود برخی از شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با تیمار پروبیوتیک بدون ریزپوشانی بوده و می‌تواند به عنوان یک روش موثر بهبود کارایی پروبیوتیک استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ریزپوشانی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، آلژینات/کیتوزان، قزل‌آلای رنگین کمان، شاخص‌های ایمنی

مقدمه

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

Dezfooli et al., 2018). همچنین باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های آبزیان باعث مشکلات بهداشتی در مصرف کننده نهایی یعنی انسان نیز می‌گردد (Caruso et al., 2013).

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

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

(Masoomi Dezfooli et al., 2018). ریزپوشانی، به طور موفقیت آمیزی برای حفاظت سلولهای پروبیوتیک در شرایط ذکر شده مؤثر بوده (Tripathi et al., 2014) و به عنوان یکی از بهترین تکنیک‌ها جهت حفاظت از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی مطرح می‌باشد (Dong et al., 2013). ریزپوشانی در مورد پروبیوتیک‌ها فرآیندی است که توسط آن پروبیوتیک‌ها توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوئیدی به دام انداخته می‌شوند که در نتیجه پروبیوتیک‌ها از شرایط نامساعد محیطی تا زمانی که به روده برسند دور نگه داشته می‌شوند. این عمل از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایطی مثل pH پایین، اسیدیته بالا، نمک‌های صفراوی، شوک‌های گرمایی، باکتریوفاژها، مواد مضر آنتی‌بیوتیکی محافظت می‌کند. همچنین می‌تواند باعث افزایش پایداری و توزیع متوازن پروبیوتیک‌ها شود. از ترکیبات مختلفی برای پوشش پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود که رایج‌ترین آن‌ها عبارتند از: آلژینات‌ها، گزانتان، ژلان، کاراجینان، ژلاتین، سلولز، کیتوزان،... این پوشش‌ها تحت شرایط ویژه‌ای مثل دما، پی‌اچ، فشار و ... محتویات خود را رها می‌کنند (Rokka & Rantamaki, 2010; Mortazavian et al, 2007). همکاران (۲۰۱۵) به بررسی کاربرد پروبیوتیک ریزپوشانی شده با باسیلوس NP5 و پربیوتیک الیگوساکارید و همچنین اثرات سین بیوتیک آن‌ها در مواجهه تیلایپای نیل با بیماری استرپتوکوکوزیس پرداختند. همچنین یک چالش باکتریایی انجام شده در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک ریزپوشانی شده نشان داد که درصد مرگ و میر جمعی در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک ریزپوشانی شده بعد از ۲۸ روز کمتر از

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

پروبیوتیک‌ها به طور مؤثر باعث افزایش سرعت رشد، ایمنی و بهبود سلامت عمومی و میزان بقای گونه های آبزی می‌گردند (Hadi et al., 2014; Hai, 2015; Naseri et al., 2013; Pourgholam et al., 2017). که این کار را از طریق موادی نظیر ترکیبات بازدارنده، رقابت بر سر مواد شیمیایی و مکان‌های اتصال و تحریک و تقویت سیستم ایمنی انجام می‌دهند (Andani et al., 2012). امروزه تمایل به مصرف ترکیباتی نظیر پروبیوتیک‌ها در حال افزایش است (Ringo et al., 2014)، تا بتوان تولیدی پربازده و پایدارتر با استفاده از مواد طبیعی و بدون استفاده از مواد شیمیایی عرضه نمود (Liu et al., 2013).

اثربخشی استفاده از پروبیوتیک‌ها گرچه در محیط‌های کشت به اثبات رسیده است، اما انتقال مؤثر مواد فعال زیستی همچنان یک چالش است (Masoomi Dezfooli et al., 2018). بنابراین به منظور حفظ پروبیوتیک‌ها در مراحل آماده سازی، ذخیره سازی و مصرف، می‌بایست آماده سازی و انتقال آن‌ها به نحو مناسبی انجام گیرد (Chavarri et al., 2012). زیرا آن‌ها به دلیل حساسیت به شرایط مختلف نظیر دمای بالا، شرایط اسیدی، نمک‌های صفراوی موجود در دستگاه گوارش، باکتریوفاژها، مواد مضر آنتی‌بیوتیکی نیاز به روشهایی برای افزایش قابلیت زیستی دارند تا بتوانند به تعداد کافی توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوئیدی به محیط روده راه یابند و در آنجا اثرات سودمند خود را ایفا کنند (Tripathi et al., 2014). روشهای مختلف محافظت پروبیوتیک در شرایط نامناسب گوارشی گزارش شده است

در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و بر اساس استاندارد مک فارلند با غلظت 10^9 $\times 2/4$ باکتری زنده در هر میلی لیتر تنظیم شدند.

ریزپوشانی به روش امولسیون داخلی (Internal emulsification):

بر اساس روش Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) ابتدا ۵ گرم پودر کربنات کلسیم به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد. مقدار ۷ میلی لیتر سوسپانسیون کربنات کلسیم به ۱۱۰ میلی لیتر محلول آلژینات ۲٪ بر روی دستگاه هم زن مغناطیسی با دور ۲۰۰ rpm در حال گردش اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه هموزن گردید. ۱۰۰ میلی لیتر از محلول حاصل با ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت $10^{10} \times 1$ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن با دور ۳۵۰ rpm هموزن گردید. در بشر دیگر مقدار ۷۰ میلی لیتر روغن زیتون با ۱ گرم اسپن ۸۰ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm هم زده شد، سپس محلول حاصل با محلول بالا مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن آزمایشگاهی هموزن گردید. ۲۰ میلی لیتر روغن زیتون و ۱ میلی لیتر اسید استیک با هم مخلوط و قطره قطره به محلول فوق اضافه گردید. به نحوی که pH به حدود ۳/۵ رسید. سپس ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰ rpm هم زده شد. سپس جهت جداسازی روغن، با استفاده از بافر فسفات محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در مرحله نهایی میزان ۳۰ میلی لیتر محلول کیتوزان ۴٪ در اسید استیک ۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه قطره قطره با دور ۸۰۰ rpm به محلول اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در حال چرخش گذاشته شد تا هم زده شود. محصول در

گروه کنترل می باشد (Ghosh et al., 2016). در مطالعه حسینی (۱۳۹۶) استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده به طور معنی داری سبب بهبود شاخصهای ایمنی غیراختصاصی اعم از فعالیت کمپلمان، لایزوزیم، قدرت باکتری کشی سرم و ایمنوگلوبین در تیمارهای ریزپوشانی شده نسبت به تیمار شاهد گردید.

بنابراین با توجه به اهمیت استفاده بهینه از پروبیوتیک ها در آبری پروری، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر شاخصهای ایمنی ماهی قزل آلابی رنگین کمان انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه باکتری پروبیوتیک

در این تحقیق از باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*) استفاده گردید. این باکتری با استفاده از ژن 16S rRNA توسط محمدیان و همکاران (۱۳۹۲) جداسازی و شناسایی شد و با توالی یابی ژن مورد نظر تشخیص جنس و گونه باکتری تایید گردید. باکتری مورد نظر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی کشت اولیه گردید. سپس با رشد کلونی های باکتریایی تک، یک کلونی خالص به محیط کشت MRS Broth به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط بی هوازی و در انکوباتور کشت داده شد. پس از رشد، نمونه ها با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شده و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله

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

محل انجام آزمایش

این تحقیق به مدت سه ماه با پرورش ماهیان تیمارهای مختلف در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰۰ لیتر همراه با شرایط محیطی کنترل شده و یکسان انجام پذیرفت. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای $11/5 \pm 0/7$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن $7 \pm 0/4$ میلی‌گرم در لیتر، سختی 22 ± 250 میلی‌گرم در لیتر و میزان pH برابر با $0/2 \pm$ و تعویض آب مخازن (جریان آب) به صورت ثقلی انجام شد.

تیمار بندی ماهیان

برای این کار تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی $25/53 \pm 82$ گرم (انحراف معیار \pm میانگین) از مزرعه پرورشی واقع در شهرستان بویراحمد تهیه و بعد از انتقال به مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی شهید

مطهری به مدت ۲ هفته آدپتاسیون ماهیان با شرایط جدید انجام گرفت. ماهیان به صورت تصادفی به ۴ گروه در سه تکرار تقسیم، و به شرح زیر پرورش یافتند (جدول ۱). جهت آماده سازی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید. به این منظور باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط آبگوشت در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شستشو شده و به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند 8×10^8 (۲/۴ × ۱۰^۸) تنظیم گردید. بعد از ریزپوشانی باکتری‌ها، از آنها برای ایجاد غلظت 5×10^7 باکتری در گرم خوراک ماهی‌ها استفاده شد. در این مرحله لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی، آلژینات و کیتوزان، باکتری به تنهایی و سرم فیزیولوژی به عنوان تیمارهای مورد آزمایش بر روی غذای محاسبه شده برای هر تیمار (بر اساس وزن، درجه حرارت) اسپری گردیدند.

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی

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

شده، از روز ۶۰ تا ۷۵ (پایان دوره) با جیره‌ی بدون مکمل پروبیوتیکی ادامه پیدا کرد. نمونه‌گیری در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ انجام گرفت. بعد از خونگیری از ماهی‌ها، پلاسماي خون با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور انجام شد.

تغذیه ماهیان براساس بیوماس و درجه حرارت آب و طبق توصیه کارخانه سازنده خوراک به مدت ۶۰ روز صورت گرفت (جدول ۲). جهت بررسی ماندگاری باکتری و تأثیر آن روی سیستم ایمنی بدن میزبان، غذاهای نیمی از هر گروه از ماهیان، به منظور بررسی ارزیابی مدت ماندگاری اثر پروبیوتیک‌های ریزپوشانی

جدول ۲- آنالیز ترکیبات جیره مورد استفاده در آزمایش، تهیه شده از شرکت ۲۱ بیضاء

نوع جیره	اندازه (mm)	فسفر (حداقل)	رطوبت (حداکثر)	انرژی (Kcal/kg)	فیبر خام (حداکثر)	چربی	پروتئین خام
Ex-TG2	۳/۳-۲/۴	۰/۸	۱۰٪	۴۳۰۰	۲/۰۲	۱۴/۰۵	۴۴٪

قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۵- ۵۰ سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلوبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع و پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگار ایجاد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلوبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد.

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

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

اندازه‌گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده گردید (Brata et al, 1993). برای این کار ابتدا آگارز ۱/۵٪ در بافر فسفات pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه و مقدار 1×10^8 گلوبول

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم

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

سانتریفوژ، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Secombes, 1998).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد ($p < 0/05$). همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel انجام گرفت. در پایان نتایج با نرم‌افزار SPSS مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر شاخص تعداد گلبول قرمز خون تأثیر معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). به طوری که، میزان گلبول قرمز خون در تیمار تغذیه شده با ملاس دو درصد و در تیمارهای حاوی ملاس که در مواجهه با نانو تیتانیوم قرار گرفته بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان گلبول قرمز خون در تیمار تغذیه شده با ملاس نیم و یک درصد و در تیمار نانو تیتانیوم نیز اثر افزایشی داشت، ولی با گروه شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

میزان فعالیت کمپلمان در روزهای مختلف در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0/05$)، هر چند افزایش نسبی در میزان فعالیت کمپلمان در روز ۶۰ در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید که این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۳).

میزان توتال پروتئین در روز ۳۰ در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون افزایش معنی‌داری نسبت به

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

اندازه‌گیری پروتئین کل، گلوبولین پلاسما و غلظت ایمنوگلوبولین تام

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

اندازه‌گیری احیاء NBT (Nitro Blue Tetrazolium):

برای ارزیابی احیاء NBT مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشت، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل فرماید اضافه گردید. سپس از نمونه

در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0/05$). همچنین تیمارهای مذکور به طور نسبی دارای میزان گلوبولین بیشتری نسبت به تیمار ۳ نشان دادند. میزان آلبومین و قدرت احیاء در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳).

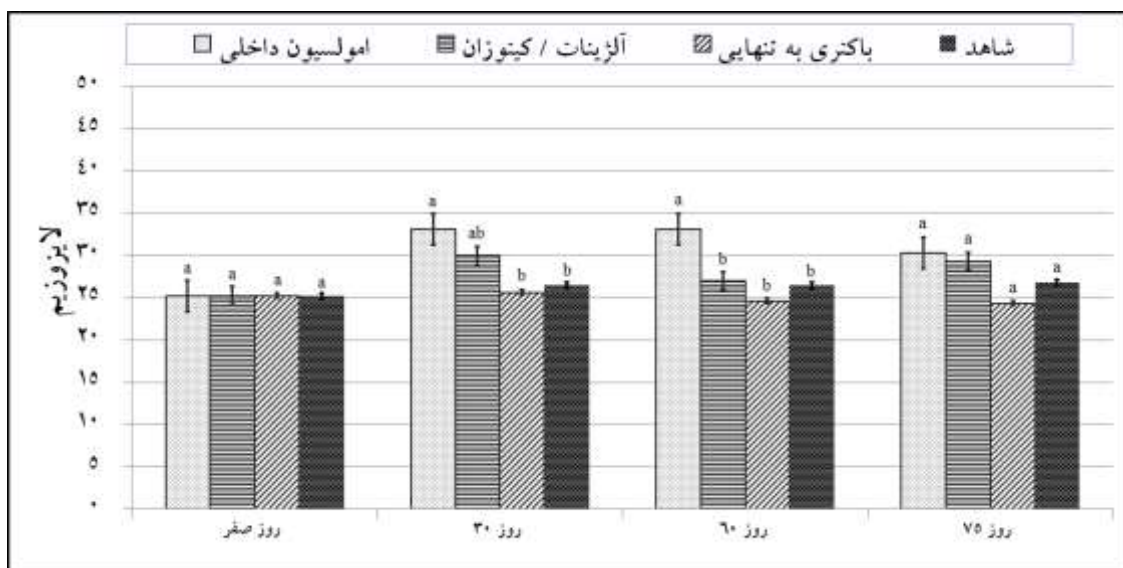
سایر تیمارها نشان داد ($p < 0/05$). همچنین در روز ۶۰ این میزان در تیمار ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p < 0/05$). تیمار ۳ نیز علی‌رغم افزایش نسبی، از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). با تغذیه از جیره های آزمایشی در روز ۳۰ میزان گلوبولین سرم در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. در روز ۶۰ نیز میزان گلوبولین

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

شاخص	تیمار	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
کمپلمان	T1 (امولسیون داخلی)	۵/۵۰±۱/۱۹ ^a	۵/۶۶±۱/۷۵ ^a	۵/۶۶±۲/۲۵ ^a	۵/۵۰±۱/۶۴ ^a
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۵/۵۰±۱/۱۹ ^a	۵/۱۶±۱/۹۴ ^a	۵/۱۶±۱/۸۳ ^a	۵/۳۳±۲/۱۶ ^a
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۵/۵۰±۱/۱۹ ^a	۵/۰۸±۱/۳۵ ^a	۵/۳۳±۲/۱۶ ^a	۵/۵۰±۱/۸۷ ^a
	T4 (شاهد)	۵/۵۰±۱/۱۹ ^a	۵/۳۳±۱/۲۵ ^a	۵/۰۰±۱/۷۸ ^a	۵/۸۳±۱/۹۴ ^a
توتال پروتئین	T1 (امولسیون داخلی)	۵/۲۲±۰/۴۳ ^a	۵/۹۰±۰/۵۷ ^a	۵/۷۰±۰/۲۴ ^{ab}	۵/۵۷±۰/۶۲ ^a
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۵/۲۲±۰/۴۳ ^a	۵/۹۶±۰/۳۶ ^a	۵/۹۶±۰/۳۸ ^a	۵/۷۱±۰/۸۶ ^a
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۵/۲۲±۰/۴۳ ^a	۵/۱۵±۰/۶۳ ^b	۵/۱۹±۰/۲۹ ^{bc}	۵/۳۰±۰/۴۴ ^a
	T4 (شاهد)	۵/۲۲±۰/۴۳ ^a	۵/۲۰±۰/۲۸ ^b	۵/۰۳±۰/۳۶ ^c	۵/۳۱±۰/۵۷ ^a
آلبومین	T1 (امولسیون داخلی)	۲/۶۹±۰/۲۶ ^a	۲/۸۳±۰/۶۵ ^a	۲/۷۱±۰/۳۳ ^a	۲/۸۰±۰/۶۰ ^a
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۶۹±۰/۲۶ ^a	۲/۸۰±۰/۵۸ ^a	۲/۸۲±۰/۴۲ ^a	۲/۸۰±۰/۴۸ ^a
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۲/۶۹±۰/۲۶ ^a	۲/۸۵±۰/۴۳ ^a	۲/۷۴±۰/۲۲ ^a	۲/۸۳±۰/۵۸ ^a
	T4 (شاهد)	۲/۶۹±۰/۲۶ ^a	۲/۸۰±۰/۵۱ ^a	۲/۷۷±۰/۶۱ ^a	۲/۷۱±۰/۳۷ ^a
گلوبولین	T1 (امولسیون داخلی)	۲/۵۲±۰/۳۴ ^a	۳/۰۶±۰/۳۷ ^a	۲/۹۹±۰/۴۴ ^a	۲/۷۷±۰/۳۳ ^a
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۵۲±۰/۳۴ ^a	۳/۱۶±۰/۵ ^a	۳/۱۴±۰/۳۸ ^a	۲/۹۱±۰/۴۳ ^a
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۲/۵۲±۰/۳۴ ^a	۲/۳۰±۰/۴۴ ^b	۲/۴۵±۰/۲۲ ^{ab}	۲/۴۶±۰/۴۹ ^a
	T4 (شاهد)	۲/۵۲±۰/۳۴ ^a	۲/۳۹±۰/۴۴ ^b	۲/۲۶±۰/۹۰ ^b	۲/۶۰±۰/۴۲ ^a
NBT	T1 (امولسیون داخلی)	۰/۴۴±۰/۰۹ ^a	۰/۵۴±۰/۰۹ ^a	۰/۵۳±۰/۱۳ ^a	۰/۵۳±۰/۱۲ ^a
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۰/۴۴±۰/۰۹ ^a	۰/۵۲±۰/۱۱ ^a	۰/۴۴±۰/۰۸ ^a	۰/۴۹±۰/۱۵ ^a
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۰/۴۴±۰/۰۹ ^a	۰/۴۳±۰/۱ ^a	۰/۴۴±۰/۰۷ ^a	۰/۴۳±۰/۰۸ ^a
	T4 (شاهد)	۰/۴۴±۰/۰۹ ^a	۰/۵۴±۰/۰۶ ^a	۰/۴۴±۰/۰۶ ^a	۰/۴۸±۰/۱۱ ^a

میزان فعالیت لایزوزیم پلاسما در روز ۳۰ آزمایش در تیمار ۱ به طور معنی داری فعالیت بیشتری (۳۳/۱۶±۳/۵۴) نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p>0/05$). این در حالی است که فعالیت لایزوزیم در سایر تیمارها تفاوت معنی داری با هم نداشت. همچنین تیمار ۲ نیز به طور نسبی دارای فعالیت لایزوزیم بیشتری (۳۰±۵/۸۳) نسبت به تیمارهای ۳ (۲۵/۶۶±۴/۳۶) و ۴

آزمایشی نیز میزانی از لایزوزیم در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی به طور معنی داری (۳۳/۱۶±۰/۷۵) بیشتر از سایر تیمارها بود ($p>0/05$). با قطع جیره‌های آزمایشی و استفاده از جیره ای معمول، در روز ۷۵ اختلاف معنی داری در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید (شکل ۱).



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

افزایش زنده‌مانی باکتری لاکتوباسیلوس/امنوسوس در شرایط معده و روده فزل‌آلای رنگین‌کمان، این باکتری به وسیله آلژینات/کیتوزان به روش امولسیون داخلی ریزپوشانی شده و اثر آن بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی مورد بررسی قرار گرفت.

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

بحث

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در آبزیان در حال افزایش می‌باشد. اهمیت روزافزون پروبیوتیک‌ها از یک طرف و قابلیت زنده‌مانی اندک این میکروارگانیسم‌ها در حین عبور از دستگاه گوارش عمدتاً به دلیل pH پایین و نمک‌های صفراوی از طرف دیگر، باعث شده تا پژوهشگران همیشه به دنبال راه‌هایی برای افزایش ماندگاری این میکروارگانیسم‌ها باشند (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۸). با این حال هنوز نیاز به تحقیقات زیادی در این مورد می‌باشد. به منظور

لایزوزیم به عنوان یکی از مولکول‌های دفاعی مهم ماهیان در سیستم ایمنی ذاتی بوده و بنابراین دارای فعالیت باکتری‌کشی می‌باشد (Mohammadian *et al.*, 2019). فعالیت ضدباکتریایی این آنزیم مربوط به هیدرولیز پیوندهای N-استیل گلوکز آمین و N-استیل مورامیک اسید می‌باشد (Tukmechi *et al.*, 2007). فعالیت لایزوزیم بوسیله وضعیت ایمنی ماهی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mohammadian *et al.*, 2019). با توجه به اینکه مقادیر این آنزیم در سرم خون، منعکس کننده سلول‌های فاگوسیت کننده می‌باشد، بنابراین می‌توان تقویت سیستم ایمنی در ماهیان را در نتیجه افزایش این آنزیم انتظار داشت (بهر روز خوش قلب و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج این تحقیق افزایش میزان فعالیت لایزوزیم را در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش نسبت به سایر تیمارها نشان داد. مشابه با این نتایج، مطالعات زیادی افزایش میزان فعالیت لایزوزیم را به علت استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده در گونه‌های مختلف ماهی گزارش نموده اند (Gupta *et al.*, 2014).

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

هرچند در این مطالعه از لحاظ عددی و مقدار شاهد بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی بودیم ولی بر اساس آزمون

تجزیه واریانس یکطرفه این افزایش نسبت به سایر تیمارها معنی دار نبود. این افزایش می‌تواند به دلیل توانایی پروبیوتیک‌ها در تحریک بیان گیرنده‌های کمپلمان باشد (Pirarat *et al.*, 2015). در مطالعه Mohammadian و همکاران (۲۰۱۹) بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در روز ۶۶ آزمایش در تیمار تغذیه شده با *L. bulgaricus* مشاهده گردید. در مطالعه Pourgholam و همکاران (۲۰۱۷) میزان فعالیت کمپلمان سرم تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) در جیره‌های حاوی مقادیر متفاوت باکتری *L. plantarum* به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد گزارش گردید. بطور کلی نتایج مطالعاتی که تاکنون انجام شده به صراحت نشان داده که استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای مانند پروبیوتیک‌ها در جیره ماهیان بر روی سیستم کمپلمان تاثیرگذار می‌باشد (Ai *et al.*, 2011). به عنوان مثال در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۱) بیان شد که سیستم کمپلمان ماهی هامور تحت تاثیر پروبیوتیک‌های *L. lactis* و *E. faecium* قرار گرفته و افزایش یافته‌است. اختلاف در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات پیشین احتمالاً ناشی از نوع پروبیوتیک مصرفی، سطح بکارگیری و نوع گونه ماهی می‌باشد (Hoseinifar *et al.*, 2017). همچنین ثابت شده‌است که اثر برخی از پروبیوتیک‌ها بر روی فعالیت سیستم کمپلمان ماهی تا حد زیادی به مدت زمان استفاده از جیره وابسته است (Sun *et al.*, 2011). پس یکی از عواملی که در مطالعه تاثیر پروبیوتیک‌ها بر روی سیستم ایمنی می‌بایست مورد توجه قرارگیرد رابطه تعاملی بین جیره و مدت زمان اجرا می‌باشد.

در مطالعه Andani و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت کمپلمان ماهی قزل آلائی رنگین کمان در طی ۳۰ روز

(۲۰۱۵) می باشد که طی آن اثرات باکتری ریزپوشانی شده *Shewanella putrefaciens* را در ماهی شانک *Sparus aurata* مورد بررسی قرار داده و بیان نمود که میزان ایمونوگلوبولین بالاتر از تیمار کنترل بود. همچنین Jafarzadeh و همکاران (۲۰۱۵) افزایش میزان ایمونوگلوبولین سرم را در بررسی اثرات سین بیوتیک Biomin IMBO بر روی تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) گزارش نمودند. در مطالعه دیگری تاثیر پروبیوتیک *L. acidophilus* بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias batrachus*) مورد بررسی قرار گرفته و افزایش میزان گلوبولین در طی دوره آزمایش نسبت به گروه کنترل بدست آمد (Al-Dohail et al., 2009).

بر اساس یافته های بدست آمده می توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک ریزپوشانی شده *L. rhamnosus* به روش امولسیون داخلی در جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان می تواند سبب بهبود برخی از پاسخ‌های ایمنی این ماهی گردد. و افزایش در برخی پارامترهای ایمنی مانند لایزوزیم، توتال پروتئین و گلوبولین نشان‌دهنده وضعیت سلامت ماهی بوده که می تواند باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا در برابر عوامل بیماریزا و محرک‌های ایمنی گردد. همچنین که طی مطالعه‌ای محمدیان و همکاران (۱۳۹۸) دریافتند که ریزپوشانی باکتری با نانوذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری *L. plantarum* را بهبود بخشیده و می تواند عملکرد مثبت پروبیوتیکی بر فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسما فیل ماهی (*Huso huso*) را بهبود بخشد. بنابراین بر اساس پژوهش انجام شده می توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی

تغذیه *L. plantarum* افزایش معنی داری نشان نداد. Merrifield و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی *E. faecium* به صورت خوراکی در ماهی قزل آلا افزایش معنی داری را در طی ۱۰ هفته تغذیه گزارش نکردند. Sun و همکاران (۲۰۱۰) کاهش در میزان فعالیت کمپلمان سرم بعد از ۶۰ روز تغذیه با جیره های حاوی *B. clausii* و *B. pumilus* را نسبت به گروه کنترل مشاهده نمودند. افزایش سطح پروتئین های سرم به عنوان شاخصی مناسب جهت بررسی وضعیت سلامت و دفاع ایمنی ماهی مطرح می باشد. فراوانترین پروتئین در پلاسما شامل آلبومین و گلوبولین می باشند. اندازه گیری میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم ماهیان می تواند به عنوان شاخصی جهت ارزیابی وضعیت سلامت و پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گیرد (علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶). میزان این عوامل در بین گونه‌های مختلف ماهی و در شرایط محیطی مختلف، متفاوت می باشد (حسینی، ۱۳۹۶) و می تواند باعث ایجاد اثرات مثبتی بر روی پاسخ‌های ایمنی سرم خون ماهیان گردد (اکبری و همکاران، ۱۴۰۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان پروتئین کل و گلوبولین در روز ۳۰ آزمایش در تیمارهای ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی و آلژینات / کیتوزان نسبت به سایر تیمارها دارای افزایش معنی دار بود. همچنین در روز ۶۰ آزمایش نیز میزان پروتئین کل در تیمارهای مذکور نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی دار بود. میزان گلوبولین در تیمارهای ریزپوشانی شده و آلژینات / کیتوزان دارای اختلاف معنی دار نسبت به تیمار شاهد بود، در صورتی که نسبت به تیمار تغذیه شده با باکتری به تنهایی اختلاف معنی داری را نشان ندادند. نتایج بدست آمده مشابه با نتایج Cordero و همکاران

ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در فیل ماهی جوان (*Huso huso*). پایان نامه دکتری دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۱۵ صفحه.

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

۵. سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۸. معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه، گروه برنامه ریزی و آمار. ۲۰۱ صفحه.

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

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

۸. قربانزاده، ر. و س. نظری، ۱۳۹۶. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، انتشارات سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه، گروه برنامه ریزی و آمار. ۱۵۷ صفحه.

۹. محمدیان، ت.، ۱۳۹۲. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیریت *Barbus grypus*.

پروبیوتیک‌ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی معده و روده ایفا می‌کند. به نظر می‌آید جهت درک پیچیدگی‌های روابط بین پروبیوتیک‌ها و تحریک سیستم ایمنی مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. اکبری، ح.، حسینی شکرابی، س.پ.، سلطانی، م.، شمسی، م.، ۱۴۰۰. تأثیر مقادیر مختلف پروبیوتیک *Enterococcus faecium* بر برخی شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۵(۲)، ۱۵-۲۶.
۲. بهروز خوش قلب، م.ر.، آذری تاکامی، ق.، خارا، ح.، و کاظمی، ر.، ۱۳۹۲. بررسی تاثیر سطوح مختلف *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهای ایمنی خون بچه ماهی قزل-آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۳(۶)، ۶۶-۵۳.
۳. حسینی، س.ص.، ۱۳۹۶. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک ایمنی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس

- (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish, 60, 50-58.
16. Brata, O., 1993. Veterinary Clinical immunology laboratory, Bar-Lab Inc, Vo12, section 3, 24-25.
17. Caruso, D., Lusiastuti, A.M., Slembrouck, J., Komarudin, O. and M. Legendre., 2013. Traditional pharmacopeia in small scale freshwater fish farms in west Java, Indonesia: An ethnoveterinary approach. Aquaculture, 416, 334-345.
18. Chavarri, M., Maranon, I., Villaan, M.C., 2012. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. INTECH Open Access Publisher, 501-540.
19. Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapiapaniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C., & Esteban, M. Á., (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & shellfish immunology, 45(2), 608-618.
20. Dong, Q.Y., Chen, M.Y., Xin, Y., Qin, X.Y., Cheng, Z., Shi, L.E., 2013. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. International Journal of Food Science and Technology, 48, 1339-1351.
21. Ghosh, B., Cain, K.D., Nowak, B.F., Bridle, A.R., 2016. Microencapsulation of a putative probiotic Enterobacter species, C6-6, to protect rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): against bacterial cold water disease. Journal of Fish Diseases, 39, 1-11.
22. Gupta, A., Gupta, P., Dhawan, A., 2014. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. Fish and Shellfish Immunology, 41(2), 113-119.
23. Hadi, J.A., Gutierrez, N., Alfaro, A.C., Roberts, R.D., 2014. Use of probiotic bacteria to improve growth and survivability of farmed New Zealand abalone (*Haliotis iris*). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 48, 405-415.
- پایان نامه دوره دکترای Ph.D، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، ۱۸۴ صفحه.
۱۰. محمدیان، ت. بیتا، س. و ناصری، ر.، ۱۳۹۸. تاثیر لاکتوباسیلوس پلانناروم ریزپوشانی شده با آلترینات / کیتوزان بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون در فیل ماهی (*Huso huso*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۴ (۱)، ۹۳-۱۰۳.
۱۱. محمودی کیا، ز و ایمانی، ا.، ۱۳۹۷. شیوه‌های مختلف تقویت سیستم ایمنی آبزیان. فصلنامه علوم آبی‌پروری پیشرفته، ۲ (۲)، ۲۹-۴۱.
12. Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J., & Zhang, W., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructo oligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317(1), 155-161. 16.
13. Al-Dohail, M. A., Hashim, R., & Aliyu-Paiko, M., 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquaculture Research, 40(14), 1642-1652.
14. Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkini, S. And Sheikhzadeh, N., 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology, 28, 728-734.
15. Bahi, A., Guardiola, F.A., Messina, C., Mahdhi, A. Cerezuela, R., Santulli, A., Bakhrouf, A. and Esteban, M.A., 2017. Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream

32. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T. M., & Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture nutrition*, 16(5), 496-503.
33. Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 305-319.
34. Mohammadian, T., Tulaby Dezfily, Z., Ghanei Motlagh, R., Jangaran-Nejad, A., Hosseini, S.S., Khaj, H., & Alijani, N., 2019. Effect of Encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on Innate Immune System and Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Post-Administration of Pb. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09544-7>.
35. Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohravandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of Probiotic microorganisms, *Iranian Journal of biotechnology*, 5, (1), 1-18.
36. Naseri, S., Khara, H., Shakoory, M., 2013. Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) fry. *Journal of Applied Animal Research*, 41(3), 318-325.
37. Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29, 2-14.
38. Planas M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez M. P. and Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240, 313-329.
39. Pourgholam, M.A., Khara, H., Safari, R., Yazdani Sadegh, M.A., Aramli Sadati, M.S., 2017. Influence of *Lactobacillus plantarum* Inclusion in the Diet of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on
24. Hai, N.V., 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 917-935.
25. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., Esteban, M., A., 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 47, 706-711.
26. Hoseinifar, S.H., khodadadian Zou, H., Kolangi Miandare, H., Hienvan, D., Romano, N. and Dadar, M., 2017. Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: Effects on skin mucosal immunity and growth performance. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 346-352.
27. Huiyi, S., Weiting, Y; Meng, G; Xiudong, L; Xiaojun, M., 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate polymers*, 96, 181-189.
28. Jafarzadeh, E., Khara, H., & Ahmadnezhad, M., 2015. Effects of synbiotic (Biomin IMBO) on haematological and immunological components of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti*. *Comparative Clinical Pathology*, 24(6), 1317-1323.
29. Liu, W. and Saint, D. A., 2013. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical biochemistry*, 302, 52-59.
30. Lukman, A., Widanarni and Munti, Y., 2015. Application of micro-encapsulated Probiotic Bacillus NP5 and Prebiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) to Prevent Streptococcosis on Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Microbiology*, 10 (12), 571-581.
31. Masoomi dezfooli, S.S., Maddox, N.G., Alfaro, A., and Seyfoddin, A., 2018. Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1-30.

- Shellfish Immunology, 29(5), 803-809. 153.
47. Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Song, K., & Li, J. S., 2011. Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 281-289.
48. The state of world fisheries and aquaculture. 2020. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en>.
49. Tripathi, M.K. and Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
50. Tukmechi, A., Morshedi, A. and Delirez, 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.
51. Vine, N.G; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS microbiological Reviews*, 30, 404-427.
52. Wang, W., Sun, J., Liu, C. and Xue, Z., 2017. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1), 1-23.
- Performance and Hematological Parameters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(1), 1-5.
40. Pirarat, K., Pinpimai, C., Rodkhum, N., Chansue, E.L., Ooi, T., Katagiri, M., Maita, R., 2015. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. *Animal Feed Science Technology*, 207, 93-103.
41. Ringo, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H. and Davies, S.J., 2014. Prebiotics in finfish: an update. In: Merrifield D, Ringo E, editors. *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing.
42. Rokka, S., Rantamaki, P., 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for Industriera applications. *European Food Research and Technology*. 231, 1-12.
43. Secombes, C.J., Zou, J.; Laing, K.; Daniels, GD. and Cunningham, C., 1998. Cytokine genes in fish. *Aquaculture*, 171, 93-102.
44. Silva, G.V., Saad, H.S.R., Garido, G.F.A., Reyes, L.M., Spinosa, A.A., and Jimenez, J.M., 2017. Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and PCR-DGGE characterization of its intestinal bacterial community. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(5), 1031-1043.
45. Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S., and Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 37 (1), 60-65.
46. Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., & Lin, W. Y., 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish &*

Effects of microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* by internal emulsification with alginate / chitosan on some of the immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Hosseini, S.A.^{1*}, Kochanian, P.², Alishahi, M.³, Mohammadian, T.³, Zakeri, M.²

1- Shahid Motahary Cold Water Fishes Genetic and Breeding Research Centre, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Yasoj, Iran.

2- Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz- Iran.

Received: 8 January 2024

Accepted: 5 March 2024

Abstract

The application of probiotics in aquaculture has been increased in recent years due to the many benefits for fish health. The most important factors in reducing the viability of probiotics during passing through the digestive system are low pH in stomach and proteases and bile salts. Encapsulating of probiotics within biodegradable nanoparticles has been found to increase their viability and efficiency in fish gut. In the current study, the effects of microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* by internal emulsification with alginate / chitosan on some of the immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were evaluated. An experiment was designed with four treatments each with three replicates. 480 juvenile rainbow trout average (\pm SD) initial weight of 25.53 ± 0.82 g was assigned to fifteen experimental tanks. Fish in T1 received *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated by internal emulsification with alginate / chitosan, T2 were fed with alginate/chitosan enriched free probiotic diet, T3 received bacteria without any encapsulation and T4 received basic diet as a control group. All treatments were fed with experimental diets for 60 days. Fish were sampled on days 30 and 60 and some of the immunological parameters consist of Lysozyme, Complement, Total protein, Albumin, Globulin and NBT were measured. Results showed that lysozyme in treatment of encapsulated by internal emulsification significantly was higher than other groups at day 30 and 60 of experiment ($p < 0.05$). Also, a significant increase was served in the total protein and globulin in T1 and T2 at day 30 compared to the other groups and at day 60 compared to the control group ($p < 0.05$). Generally, it can be concluded that the microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* by internal emulsification with alginate / chitosan has significant effects on some of the immunological parameters in rainbow trout and improved the immune responses in this fish.

Keywords: Rainbow trout, *Lactobacillus rhamnosus*, Alginate / chitosan, Immunological parameters

* Corresponding Author: hoseiniabdolhamid@gmail.com