

[20.1001.1.20080026.1401.15.4.5.5](https://doi.org/10.1001.1.20080026.1401.15.4.5.5)

اثرات تغذیه ای مکمل پری بیوتیکی بر پایه ساکارومیسس سرویسه و مانان الیگوساکارید بر میزان گلوکز و کورتیزول در استرس های محیطی و مواجهه تجربی با بیماری فورونکلوزیس در ماهی قزل آلی رنگین کمان

*امین خدادادی^۱، مرضیه السادات حسینی^۲

^۱ دامپزشک و متخصص بهداشت و بیماری های آبیان، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران

^۲ دامپزشک بخش خصوصی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۶

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تکمیل جیره ماهی قزل آلی رنگین کمان با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس که حاوی ترکیبات فعال دیواره ای ساکارومایسیس سرویسه به همراه مانان الیگوساکارید بر میزان مقاومت ماهیان قزل آلی رنگین کمان در برابر تنش های محیطی و بیماری فورونکلوزیس بود. ماهیان قزل آلی رنگین کمان با میانگین وزنی $19/08 \pm 1/45$ گرم به مدت ۶۰ روز با جیره حاوی غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس (۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) تغذیه شدند. در روز شصت مطالعه استرس های کمبود اکسیژن و افزایش دما به همراه ایجاد بیماری تجربی با سوش استاندارد *Aeromonas salmonicida* برای همه گروه های آزمایشی انجام شد. میزان گلوکز سرم خون ماهیان زیر استرس با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر و براساس روش آنزیماتیک و برای اندازه گیری کورتیزول سرم خون ماهیان زیر استرس از کیت تشخیصی کورتیزول به روش الیزا استفاده گردید. نتایج مطالعه نشان دهنده تاثیر غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس بر کاهش میزان استرس و تاثیر مثبت بر میزان گلوکز و کورتیزول در مواجهه با تنش های محیطی داشت ($P < 0/05$). همچنین میزان تلفات ماهیان تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس در مواجهه تجربی با بیماری فورونکلوزیس به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد کمتر بود. براساس این یافته ها می توان نتیجه گرفت که جهت کاهش استرس های محیطی و همچنین کاهش میزان تلفات در برابر بیماری فورونکلوزیس از غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس به همراه غذا استفاده نمود.

واژه های کلیدی: تنش های محیطی، پری بیوتیک، فورونکلوزیس، قزل آلی رنگین کمان، استرس

مقدمه

یکی از بیماری های مهم آزاد ماهیان بیماری فورونکلوزیس می باشد که هر ساله سبب زیان های اقتصادی عظیمی به صنعت آبی پروری دنیا می گردد. اسامی دیگر این بیماری، بیماری اولسر و بیماری اریتر می باشد. این بیماری باکتریایی انتشار جهانی دارد و به

عنوان یک بیماری سپتی سمی دهنده کشنده می باشد. باکتری *Aeromonas salmonicida* یک باکتری گرم منفی، میله ای و بی هوای اختیاری غیر متحرک به شکل کوکوئیدی می باشد که به شکل حاد و مزمن در ماهیان قزل آلا سبب تلفات بالا می گردد. این بیماری با افزایش درجه حرارت، کم شدن میزان اکسیژن محلول و تراکم بالا ارتباط و همبستگی مستقیم دارد. این بیماری در هر سنی ماهیان را مبتلا سازد ولی در بین

*مسئول مکاتبه: aminkhodadadi@ymail.com

روی ماهیان مختلف از قبیل آزاد ماهیان، کپور ماهیان، تیلاپیا و غیره ارزیابی نمودند.

در دسترس بودن انواع پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌های موفق مورد استفاده شده در انسان و جانوران دیگر سبب راحتی در انتخاب اولیه پروبیوتیک در صنعت آبزی‌پروری گردیده است (Azad و Al-Marzouk، ۲۰۰۸). مطب مهم درباره انتخاب پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌های شناخته شده، تفاوت‌های گونه‌ای موجودات آبزی (به دلیل شرایط محیطی و اختلافات میزبانی) نسبت به سایر جانداران می‌باشد و این تفاوت ممکن هست سبب عدم کارایی گردد. اختلافات گونه‌ای سبب گردیده است که استفاده از میکروفلور و پروبیوتیک‌های خود آبیان گسترش بیشتری نسبت به سایر پروبیوتیک‌ها داشته باشند (Merrifield و Ringo، ۲۰۱۴). در مقیاس بزرگ تولید ماهیان سردآبی، مشکلات مربوط به بیماری‌ها و عوامل استرس‌زا اغلب رخ می‌دهد و سبب بروز زیان‌های اقتصادی شدیدی می‌گردد. پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها یک جایگزین بالقوه می‌باشند که با بهره‌گیری از محافظت میزبان بصورت طبیعی ساخته می‌گردند و هیچ‌گونه آسیب و مشکل جهت محیط زیست ندارند. پروبیوتیک‌ها مزایایی از قبیل تولید ترکیبات بازدارنده، رقابت برای مواد مغذی ضروری، رقابت جهت چسبیدن به جایگاه‌ها و مهار بیان ژن حدت می‌گردند و در نهایت سبب بهبود پارامترهای رشد و پاسخ‌های سیستم ایمنی و تحمیل استرس‌های محیطی می‌گردند (Merrifield و Ringo، ۲۰۱۴).

در این بررسی از غلظت‌های مختلف محصول تجاری سل ماناکس (Celmanax®) که حاوی ترکیبات فعال دیواره‌ای مخمر ساکارومیسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*) به همراه مانان الیگوساکارید (Manan oligosaccharides)

ماهیان انگشت‌قد شایع‌تر و خطرناک‌تر می‌باشد. امروزه شناسایی روش‌های جدید بدون مصرف آنتی‌بیوتیک و مواد شیمیایی که سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر استرس‌های محیطی و بیماری‌های باکتریایی گردد، حائز اهمیت می‌باشد. اولین بار پری‌بیوتیک‌ها در آبیان در سال ۱۹۹۵ توسط Hanley و همکاران مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از آن مقالات متعددی در ارتباط با استفاده از پری‌بیوتیک‌های مختلف در ماهیان از قبیل اینولین^۱، فروکتوالیگوساکاریدها^۲، لیگوفروکتوزها^۳، مانان الیگوساکاریدها^۴، ترنس گالاتوالیگوساکاریدها^۵، گالاتوالیگوساکاریدها^۶، زایلوالیگوساکاریدها^۷، آرابین اگیلیو الیگوساکارید^۸، ایزومالتو الیگوساکارید^۹ و سایر محصولات پری‌بیوتیکی استفاده گردید (Pryor و همکاران، ۲۰۰۳؛ Genç و همکاران، ۲۰۰۶؛ Yilmaz و همکاران، ۲۰۰۷؛ Barbu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Dimitroglou و همکاران، ۲۰۰۹؛ a۲۰۱۰؛ b۲۰۱۰؛ Sweetman و همکاران، ۲۰۱۰؛ Dimitroglou و همکاران، ۲۰۱۱؛ a۲۰۱۱؛ b۲۰۱۱؛ c۲۰۱۱). مطالعات فراوانی در ارتباط با تاثیر پری‌بیوتیک‌ها در ماهیان استخوانی صورت پذیرفته است که مهمترین آنها مطالعات Burr و همکاران (۲۰۰۵)، Gatlin III و همکاران (۲۰۰۶)، Denev و همکاران (۲۰۰۹)، Yousefian و Amiri (۲۰۰۹)، Ganguly و Mukhopadhyay (۲۰۱۰)، Sweetman (۲۰۱۰)، Dimitroglou و همکاران (۲۰۱۱) اشاره نمود که بر

1. Inulin
2. Fructooligosaccharides =FOS
3. Short-chain fructooligosaccharides =scFOS
4. Oligofructose
5. Mannanligosaccharides = MOS
6. Trans-galactooligosaccharides =TOS
7. Galactooligosaccharides =GOS
8. Xylooligosaccharides =XOS
9. Arabinoxyloligosaccharides =AXOS
10. Isomaltooligosaccharides =IMO

دانشگاه ارومیه منتقل گردید. ماهیان در بدو ورود با آب نمک (۱۰ گرم در لیتر) ضد عفونی شده (Akhlaghi و Sharif Yazdi, ۲۰۰۸) و به مدت یک هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه در حوضچه های فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری نگهداری شدند. پرورش ماهیان و تغذیه آن ها با غلظت های مختلف پری بیوتیک در حوضچه های ۳۰۰ لیتری از جنس فایبرگلاس و با تراکم ۵۰ قطعه ماهی در هر حوضچه به مدت ۶۰ روز صورت گرفت.

می باشد جهت ارزیابی میزان مقاومت در برابر استرس های محیطی و بیماری فرونکولوزیس در ماهی قزل آلائی رنگین کمان استفاده شد.

مواد و روش ها

طراحی آزمایش: در این بررسی تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزنی $19/08 \pm 10$ گرم پس از اخذ گواهی سلامت از آزمایشگاه رفرانس سازمان دامپزشکی به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده آرمیا و جانوران آبی

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده پری بیوتیک سل ماناکس (Celmanax®).

درصد	اسید آمینه	درصد	مواد تشکیل دهنده
۲/۴۰٪	آلانین	۳۲٪	پروتئین خام
۱/۰۰٪	آرژنین	۴/۱۵٪	چربی خام
۳/۲۰٪	آسپارتیک اسید	۱۲٪	رطوبت
۰/۳۰٪	سیستین	۰/۵۰٪	فیبر
۴/۰۰٪	گلوتامیک اسید	۸۸/۰۰٪	ماده خشک
۱/۲۰٪	گلیسین	۶۰/۰۰٪	مجموعه مواد قابل هضم
۰/۶۰٪	هیستیدین		
۱/۳۰٪	ایزولوسین		
۲/۱۰٪	لوسین	درصد	ماده معدنی
۱/۸۰٪	لیزین	۰/۳۹٪	کلسیم
۰/۵۰٪	متیونین	۵/۲۵٪	مس
۱/۴۰٪	فنیل آلانین	۱۸۸ ppm	آهن
۱/۴۰٪	پرولین	۰/۲۹٪	منیزیم
۱/۳۰٪	سریاین	۱۸ ppm	منگنز
۱/۴۲٪	ترئونین	۱/۲۶٪	فسفر
۰/۲۴٪	تریپتوفان	۲/۶۴٪	پتاسیم
۱/۱۳٪	تیروزین	۱/۰۰٪	سدیم
۱/۳۴٪	والین	۰/۶۰٪	سلفور
		۸۲ ppm	روی

ساکارومیسس سرویسیه به همراه مانان الیگوساکارید استفاده شد. این فرآورده دارای حداقل ۳۰٪ پروتئین خام، ۴٪ چربی خام، ۱۲٪ رطوبت و ۱٪ فیبر (جدول ۱) می باشد (Kaur و Bansal, ۲۰۰۶). تغذیه ماهیان با استفاده از غذای تجاری پلت (رشد یک EX TG₁

آب مورد نیاز از طریق یک حلقه چاه نیمه عمیق تأمین شد و در طول دوره پرورش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب پرورشی به طور روزانه اندازه گیری و ثبت شد. در این بررسی شکل مایع پری بیوتیک سل ماناکس که حاوی ترکیبات فعال دیواره ای مخمر

به طور تصادفی صید شده و به درون حوضچه ۱۰۰ لیتری که با توری به دو قسمت مساوی تقسیم شده بود، انتقال یافتند. دمای آب حوضچه توسط بخاری آکواریومی در مدت زمان ۳۰ تا ۴۵ دقیقه به ۲۶ درجه سانتی گراد افزایش یافت و اجازه داده شد ماهیان به مدت ۲۴ ساعت، در این شرایط قرار بگیرند. همچنین پس از گذشت نیم ساعت از شروع استرس به طور همزمان از تمامی گروه‌ها، نمونه خون جهت اندازه‌گیری میزان کورتیزول و گلوکز گرفته شد و میزان تلفات ماهیان ثبت گردید. پارامترهای فیزیوشیمیایی آب و میزان تلفات در طول دوره استرس ثبت شد (Tukmechi و همکاران، ۲۰۱۱). پس از ثبت میزان تلفات با استفاده از فرمول محاسبه درصد بازماندگی ($100 \times \text{تعداد اولیه} / \text{تعداد تلفات} - \text{تعداد اولیه}$) اقدام به تعیین میزان درصد بازماندگی شد.

تعیین میزان مقاومت ماهیان در آلودگی تجربی با *Aeromonas salmonicida* در این تحقیق به منظور تعیین میزان مقاومت ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس در آلودگی تجربی، از باکتری بیماری‌زای *Aeromonas salmonicida* atcc33658 استفاده شد. برای ایجاد آلودگی تجربی بعد از ۶۰ روز تغذیه ماهیان با غلظت‌های مختلف پری بیوتیک از هر گروه تعداد ۲۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و در سه تکرار (هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی) تقسیم شدند. هوادهی به صورت ثابت انجام گرفت و روزانه ۵۰ درصد آب حوضچه‌ها ۱۰۰ لیتری تعویض شد. پس از آن، مقدار ۰/۱ ml از سوسپانسیون باکتری با تراکم 10^7 CFU/ml به صورت داخل صفاقی به همه ماهیان تزریق شد (تزریق برای هر ماهی به صورت انفرادی صورت گرفت). برای این منظور باکتری در محیط آبگوشت (BHI) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده و پس از

شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز) بر اساس درصد وزن زنده ماهی و دمای آب صورت گرفت (جدول ۲). در این تحقیق ماهیان گروه اول (شاهد) فقط با غذای تجاری بدون افزودن هیچ گونه پری بیوتیک تغذیه گردید و ماهیان گروه‌های دوم تا چهارم به ترتیب با غذای تجاری حاوی پری بیوتیک سل ماناکس با غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد وزن غذا تغذیه شدند. برای افزودن پری بیوتیک ابتدا مقدار غذای روزانه هر گروه محاسبه سپس مقدار مورد نیاز از پری بیوتیک را بر روی تمام قسمت‌های غذا اسپری و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در محل تمیز خشک گردید (Tukmechi و همکاران، ۲۰۱۱). تهیه غذا به صورت روزانه بود. طول دوره آزمایش ۶۰ روز بود و ماهیان تحت تیمار فقط با ماهیان گروه شاهد بدون افزودن هیچ گونه پری بیوتیک تغذیه گردیدند.

جدول ۲- آنالیز غذای تجاری رشد یک *EX TG1* شرکت بیضاء مورد استفاده در این تحقیق.

جزء	درصد	جزء	درصد
پروتئین خام	۴۵	فیبر	۲
چربی خام	۱۴	فسفر	۰/۸
انرژی قابل هضم	۴۳۰۰	رطوبت	۱۰
خاکستر	۱۰	فیبر	۲

استرس کمبود اکسیژن و دما: در استرس کمبود اکسیژن تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار (پنج قطعه ماهی از هر تکرار) صید و به حوضچه‌های ۱۰۰ لیتری انتقال یافتند. میزان اکسیژن حوضچه‌ها با افزودن مستقیم گاز ازت به ۳ ppm رسانده شده و ماهیان در این شرایط تا مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت نیم ساعت به طور همزمان از تمامی گروه‌ها، نمونه خون جهت اندازه‌گیری میزان کورتیزول و گلوکز خون گرفته شد. جهت استرس دمایی تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار (پنج قطعه ماهی از هر تکرار)

مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. قبل از مقایسه میانگین تیمارها نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های به دست آمده به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) انجام گرفت.

نتایج

داده‌های مربوط به شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب نتایج نشان داد که هیچ گونه اختلاف آماری معنی‌داری ($P < 0.05$) از نظر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی ماهیان قزل آلا در طول دوره پرورش و آزمایش وجود ندارد (جدول ۳). همچنین مقادیر همه شاخص‌ها در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود (Kelly, ۱۹۹۸).

سانتریفیوژ با دور $2500 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد، دو مرتبه با PBS شسته شدند. پس از آن سوسپانسیونی از باکتری به میزان CFU/ml $10^7 \times 1/1$ تهیه و میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از آن برای تزریق استفاده شد. مطالعه دو هفته دیگر ادامه پیدا کرد. در طی این مدت روزانه دو بار از نظر تلفات و علائم بیماری شامل غلیظ شدن موکوس بدن، دایره‌های کرکی شکل به رنگ خاکستری متمایل به شیری، نکروز لامل‌های آبششی، حالت زین شکل و نکروز باله پشتی مورد بررسی قرار گرفتند (Tukmechi و همکاران، ۲۰۱۱). به منظور تأیید تشخیص در گروه‌های مورد آزمایش، کشت باکتریایی در محیط‌های افتراقی به عمل آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA؛ نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور

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

شاخص	تیمار			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
دما (درجه سانتی‌گراد)	14.2 ± 0.2^a	14.2 ± 0.2^a	21.4 ± 0.2^a	14.2 ± 0.1^a
pH	7.88 ± 0.11^a	7.90 ± 0.11^a	7.78 ± 0.11^a	7.76 ± 0.1^a
اکسیژن محلول (mg/l)	10.10 ± 0.41^a	9.99 ± 0.57^a	10.01 ± 0.39^a	10.19 ± 0.46^a
آمونیم (mg/l)	0.56 ± 0.21^a	0.61 ± 0.26^a	0.59 ± 0.22^a	0.59 ± 0.19^a
نیترات (mg/l)	0.12 ± 0.05^a	0.11 ± 0.04^a	0.08 ± 0.02^a	0.09 ± 0.02^a

مقادیر به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.D.}$ بیان شده‌اند. اعداد در هر ردیف با حروف یکسان نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشند.

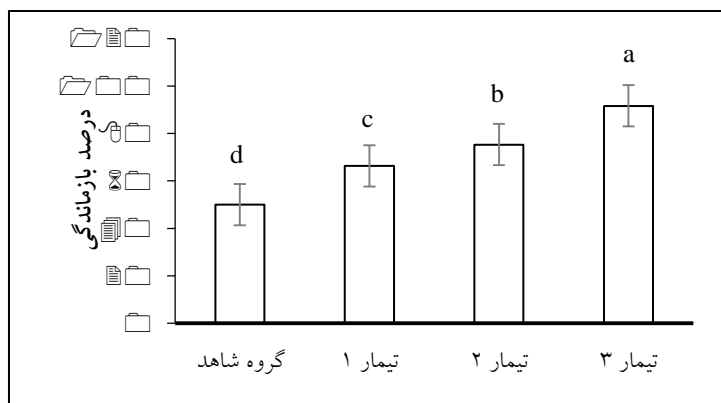
مقایسه با گروه شاهد مقاومت بیشتری در برابر کمبود اکسیژن نشان دادند. میزان متوسط زمان مرگ (تلفات ۵۰٪ جمعیت) گروه شاهد سه ساعت و سی و پنج دقیقه بود. کمترین میزان تلفات در متوسط زمان مرگ مربوط به تیمار تغذیه شده با غلظت ۱٪ پری بیوتیک

تعیین مقاومت ماهیان در برابر استرس

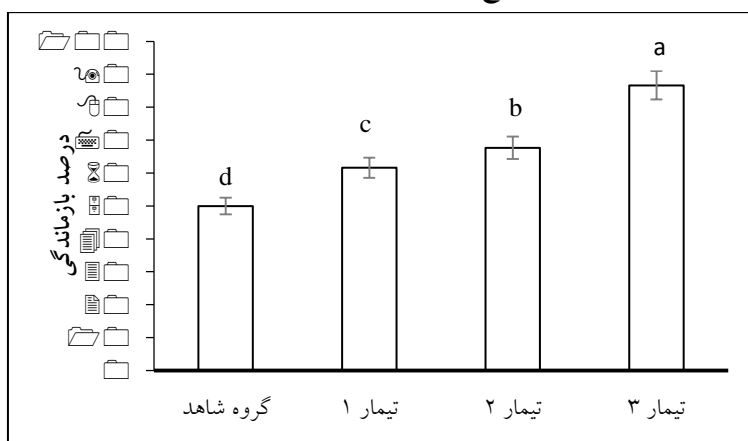
استرس کمبود اکسیژن: یافته‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص درصد بازماندگی در استرس کمبود اکسیژن نشان داد که ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱٪ و ۱٪ پری بیوتیک سل ماناکس در

بازماندگی تمامی گروه‌های تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌داری بودند ($P < 0/05$).

سل ماناکس با درصد بازماندگی ۹۱/۶۶٪ و پس از آن تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک سل ماناکس با درصد بازماندگی ۷۵/۳۳٪ و در نهایت تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک سل ماناکس با درصد بازماندگی ۶۶/۳۳٪ بود. درصد



شکل ۱- منحنی درصد بازماندگی ماهیان تیمارهای مختلف پس از مواجه شدن با استرس کمبود اکسیژن (تیمار ۱: تغذیه با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: تغذیه با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک و تیمار ۳: تغذیه با غلظت ۱٪ پری بیوتیک). حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.



شکل ۲- منحنی درصد بازماندگی ماهیان تیمارهای مختلف پس از مواجه شدن با استرس افزایش دما (تیمار ۱: تغذیه با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: تغذیه با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک و تیمار ۳: تغذیه با غلظت ۱٪ پری بیوتیک). حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

جمعیت) گروه شاهد یک ساعت و چهل و هشت دقیقه بود. کمترین میزان تلفات در متوسط زمان مرگ مربوط به تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک سل ماناکس با درصد بازماندگی ۸۶/۶۶٪ و پس از آن تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک سل ماناکس با درصد بازماندگی ۶۷/۶۶٪ و در نهایت

استرس افزایش دما: یافته‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص درصد بازماندگی در استرس افزایش دما نشان داد که ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۵٪ و ۱٪ پری بیوتیک سل ماناکس در مقایسه با گروه شاهد مقاومت بیشتری در برابر استرس افزایش دما نشان دادند. میزان متوسط زمان مرگ (تلفات ۵۰٪

میزان سطح کورتیزول سرم و گلوکز پلازما نیم ساعت پس از مواجه شدن با استرس دمایی به طور معنی داری ($P < 0/05$) نسبت به شاهد کاهش یافته است. بیشترین میزان کاهش سطح کورتیزول سرم و گلوکز پلازما در تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک مشاهده گردید. همچنین نتایج بررسی گلوکز پلازما و کورتیزول سرم ماهیان پس از استرس کاهش اکسیژن نشان دهنده کاهش معنی دار میزان سطح کورتیزول سرم و گلوکز پلازما در ماهیان تغذیه شده با غلظت های مختلف پری-بیوتیک سل ماناکس نسبت به گروه شاهد بود ($P < 0/05$).

تیمار تغذیه شده با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک سل ماناکس با درصد بازماندگی ۶۱/۶۱٪ بود. تیمارهای تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی داری بودند ($P < 0/05$).

سنجش سطح گلوکز پلازما و کورتیزول سرم: نتایج مربوط به اندازه گیری سطح گلوکز پلازما و کورتیزول سرم ماهیان نیم ساعت پس از مواجه شدن با استرس افزایش دما و کمبود اکسیژن در جدول ۴ آورده شده است. یافته های حاصل نشان می دهد که در ماهیان تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس

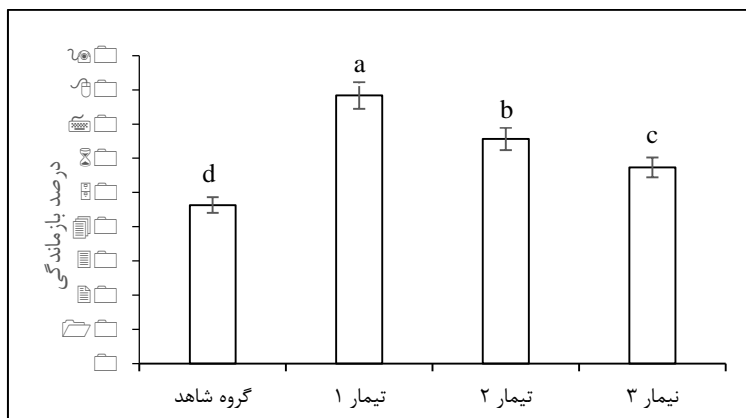
جدول ۴ - مقادیر کورتیزول سرم و گلوکز پلازما ماهیان تیمارهای مختلف نیم ساعت پس از مواجه شدن با استرس افزایش دما و کمبود اکسیژن.

استرس کمبود اکسیژن (D.O < 3 mg/l)		استرس افزایش دما (تا ۲۶ درجه سانتی گراد)		تیمار
کورتیزول (µg/dl)	گلوکز (mg/dl)	کورتیزول (µg/dl)	گلوکز (mg/dl)	
۲/۷۲۳ ± ۰/۰۵ ^a	۲۷۵ ± ۵ ^a	۲/۵۹۵ ± ۰/۰۵ ^a	۲۶۰ ± ۱۸ ^a	شاهد
۱/۰۴۷ ± ۰/۰۵ ^b	۲۵۱ ± ۵ ^b	۱/۳۳۵ ± ۰/۰۵ ^c	۱۲۴ ± ۱۶ ^c	تیمار اول
۱/۰۲۱ ± ۰/۰۵ ^c	۱۹۳ ± ۱۰ ^c	۱/۰۴۵ ± ۰/۰۵ ^d	۱۰۵ ± ۵ ^d	تیمار دوم
۰/۸۴۷ ± ۰/۰۵ ^d	۱۲۰ ± ۱۰ ^d	۱/۴۲۵ ± ۰/۰۵ ^b	۲۳۲ ± ۱۰ ^b	تیمار سوم

اعداد به صورت Mean ± S.D بیان شده اند. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح $P < 0/05$ می باشند.

پری بیوتیک سل ماناکس، $۵/۷۷ ± ۶۵/۶۶$ درصدی ماهیان تغذیه شده با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک سل ماناکس و $۵/۳۳ ± ۵۷/۳۳$ درصدی در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۱٪ پری بیوتیک بود. نتایج درصد بازماندگی ماهیان تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس در مواجهه با بیماری فورونکلوزیس دارای ارتباط آماری معنی داری نسبت به گروه شاهد از لحاظ میزان بقاء بود ($P < 0/05$).

سنجش مقاومت در برابر باکتری *Aeromonas salmonicida* نتایج آزمون چالش و میزان تلفات ماهیان در برابر باکتری عامل بیماری فورونکلوزیس در طول دو هفته در سه تکرار از هر گروه نشان از تاثیر غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس بر میزان مرگ و میر در مقایسه با گروه شاهد داشت. نتایج درصد بازماندگی، نشان از بازماندگی $۵/۷۷ ± ۷۸/۳۳$ درصدی ماهیان تغذیه شده با غلظت ۰/۱٪



شکل ۳- منحنی درصد بازماندگی ماهیان تیمارهای مختلف پس از مواجه شدن با *Aeromonas salmonicida* (تیمار ۱: تغذیه با غلظت ۰/۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: تغذیه با غلظت ۰/۵٪ پری بیوتیک و تیمار ۳: تغذیه با غلظت ۱٪ پری بیوتیک). حروف یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

ماهیان پرورشی همواره به عنوان منابع مهم تامین پروتئین در سطح دنیا و کشور ما می‌باشد. وجود بیماری‌های مختلف از قبیل بیماری‌های باکتریایی یکی از معضلات پرورش متراکم است. براساس گزارش دفتر مبارزه با بیماری‌های آبیان سازمان دامپزشکی کشور، بیماری‌های الویت دار باکتریایی ماهیان سردآبی کشور به ترتیب استرپتوکوکوزیس، فورونکولوزیس، یرسینیوزیس می‌باشد. بیماری باکتریایی فورونکولوزیس یکی از بیمارهای الویت دار مهم در جهان بوده که در سال‌های اخیر در کشور شیوع یافته و سبب مشکلات اقتصادی فراوانی گردیده است. بدون شک تقویت سیستم ایمنی می‌تواند به‌طور چشمگیری سلامتی موجود را در صورت مواجه شدن با شرایط نامساعد محیطی و نیز عوامل بیماری‌زا تضمین نماید. در این میان پری‌بیوتیک‌ها با تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی نقش ارزنده‌ای در حفظ سلامتی میزبان به عهده دارند.

در آبیان هورمون کورتیزول وظایف مختلفی دارد که می‌توان به تحریک آنزیم‌هایی در کبد برای سوخت و ساز حد واسط، تحریک گلیکوژنولیز و گلوکونئوزیز و تاثیر هیپرگلیسمیک، کنترل فرایندهای تنظیم یونی با

اثر بر کلیه، آبشش، معده و روده‌ها، سرکوب سیستم ایمنی و مهار رشد و تولید (در استرس‌های طولانی)، ممانعت از آزاد سازی پرولاکتین و افزایش تحریک سلول‌های کلرید آبشش و افزایش آنزیم Na-K-ATPase اشاره نمود.

یافته‌های حاصل از اندازه‌گیری سطح گلوکز پلاسما و کورتیزول سرم ماهیان نیم ساعت پس از مواجه شدن با استرس افزایش دما و کمبود اکسیژن نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پری‌بیوتیک سل ماناکس، میزان سطح کورتیزول سرم و گلوکز پلاسما نیم ساعت پس از مواجه شدن با استرس دمایی و استرس کاهش اکسیژن به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) نسبت به ماهیان گروه شاهد کاهش یافته است. همچنین نتایج بررسی گلوکز پلاسما و کورتیزول سرم ماهیان پس از استرس کاهش اکسیژن نشان دهنده بیشترین کاهش معنی‌دار میزان سطح کورتیزول سرم و گلوکز بترتیب در تیمارهای سوم، دوم و اول نسبت به گروه شاهد بود ($P < 0/05$) ولی نتایج بررسی گلوکز پلاسما و کورتیزول سرم ماهیان پس از استرس افزایش دما نشان دهنده بیشترین کاهش معنی‌دار میزان سطح کورتیزول سرم و گلوکز بترتیب در تیمارهای دوم،

است. در یک بررسی Robertson و همکاران (۲۰۰۰) از پروبیوتیک *C.inhibens* در ماهی قزل آلا استفاده نمودند. این باکتری توانست سبب کاهش میزان مرگ و میر در مواجهه با باکتری *آئروموناس سالمونسیدا* گردد. در بررسی دیگر Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) از باکتری *La. rhamnosus* به عنوان پروبیوتیک در ماهی قزل آلا استفاده نمودند و در زمان آزمون چالش با *آئروموناس سالمونسیدا* میزان تلفات کاهش پیدا نمود. در بررسی Iranto و Austin (۲۰۰۲) از گونه های مختلف باکتری های کوکسی گرم مثبت و *Carnobacterium sp.* استفاده نمودند و پس از مواجهه با *آئروموناس سالمونسیدا* میزان مرگ و میر در ماهیان انگشت قد کاهش پیدا نمود. همچنین Iranto و Austin در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۲ از دیواره سلولی باکتری های مرده مذکور استفاده نمودند و باز در مواجهه با *آئروموناس سالمونسیدا* میزان مرگ و میر کاهش یافت. Balcázar و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از باکتری های *Leu.mesonteroides* *Lc.lactic* و *La.sakei* میزان تلفات در ماهیان قزل آلائی مواجهه شده با باکتری *آئروموناس سالمونسیدا* را کاهش دهند. در همین سال Brunt و همکاران با استفاده از *A.sobria* و برخی از گونه های باسیلوس ها میزان تلفات ماهیان قزل آلائی رنگین کمان در مواجهه با فرونکولوزیس را کاهش دادند. Balcázar و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از باکتری های *Lc.lactis* و *Leu.mesenteroides* در استرس افزایش دما و همچنین مواجهه با باکتری *آئروموناس سالمونسیدا* در ماهی *S.trutta* سبب کاهش میزان مرگ و میر گردیدند. در یک بررسی مربوط به استفاده از پری بیوتیک، Sheikholesami و همکاران (۲۰۰۷) از پری بیوتیک اینولین با غلظت ۵-۲۰ گرم/ کیلوگرم غذا به مدت ۸ هفته در ماهی قزل آلائی رنگین کمان استفاده

اول و سوم نسبت به گروه شاهد بود ($P < 0/05$). در نهایت سنجش سطح گلوکز و کورتیزول خون ماهیان در طی استرس های مذکور نشان داد که افزودن دیواره مخمر ساکارومایسیس سروسیه و مانان الیگوساکارید به جیره ماهی قزل آلائی رنگین کمان از بالا رفتن سطح این دو شاخص به هنگام مواجهه شدن با استرس جلوگیری می نماید. نتایج این مطالعه نشان داد که بهترین غلظت پری بیوتیک سل ماناکس برای استرس های دمایی ۰/۵٪ و برای استرس کاهش اکسیژن ۱٪ می باشد.

بدون شک یکی از آزمون های مهمی که می تواند اطلاعات دقیقی از وضعیت ایمنی موجود پس از مصرف پری بیوتیک ها و پروبیوتیک ها ارائه دهد آزمون مواجهه باکتریایی است. نتایج این تحقیق نشان داد که تکمیل جیره ماهی قزل آلائی رنگین کمان با دیواره مخمر ساکارومایسیس سروسیه و مانان الیگوساکارید قادر است ایمنی این ماهی را بهبود ببخشد. بر این اساس و به منظور بررسی صحت داده های بدست آمده ماهیان در پایان ۶۰ روز تغذیه با دیواره مخمر ساکارومایسیس سروسیه و مانان الیگوساکارید به طور تجربی با باکتری *Aeromonas salmonicida* عامل بیماری کولموناریس آلوده شده و میزان مقاومت آنها به مدت دو هفته سنجیده شد. نتایج نشان دهنده کاهش درصد تلفات ماهیان تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک سل ماناکس نسبت به گروه شاهد بود. در تمامی گروه های تغذیه شده با غلظت های مختلف پری بیوتیک در مقایسه با گروه شاهد اختلاف آماری معنی داری بود ($P < 0/05$). در نهایت مصرف پری بیوتیک سل ماناکس با غلظت ۱٪ بهترین نتیجه در برابر مقاومت بیماری فرونکولوزیس را دارا بود.

در ارتباط با مصرف پروبیوتیک و پری بیوتیک و کاهش تلفات در مواجهه تجربی با بیماری فرونکولوزیس پژوهش های اندکی صورت پذیرفته

رو به جلو در جهت محدود کردن مصرف آنتی بیوتیک هدایت نماید. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که تکمیل جیره ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با دیواره مخمر ساکارومایسیس سروسیه و مانان الیگوساکارید به عنوان یک پری بیوتیک می تواند سبب کاهش استرس های محیطی و مقاومت در برابر بیماری فرضیه بهبود و تقویت پاسخ ایمنی گردد.

نمودند و در زمان مواجهه با استرپتوکوکوزیس میزان تلفات کاهش یافت.

نتایج یافته های این بررسی ثابت می کند که تغذیه با دیواره مخمر ساکارومایسیس سروسیه و مانان الیگوساکارید به عنوان یک پری بیوتیک قادر است با افزایش قوای ایمنی مقاومت ماهی قزل آلاهی رنگین کمان را در برابر بیماری افزایش دهد و ما را یک گام

منابع

- Akhlaghi, M., 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 Veterinerian Research* 9(4), 347-352.
- Azad, I.S., Al-Marzouk, A., 2008. Autochthonous aquaculture probiotics: a critical analysis. *Research Journal of Biotechnology* 3, 171-177.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Cunningham, D., Vandrell, D., Muzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173-186.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., Muzquiz, J.L., 2007. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51, 185-193.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Múzquiz, J.L., 2009. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 17, 153-157.
- Barbu, A., Sara, A., Alina, A., Bentea, M., 2008. The effect of some fodder additives on production performances of different fish species. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 65, 278-282.
- Burr, G., Gatlin, D.M. III., Ricke, S., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 36, 425-436.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 1, 1-29.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley, G., 2009. Dietary Mannan oligosaccharides supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science* 87, 3226-3234.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R. and Davies, S.J. 2010a. 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.
- Dimitroglou, A., Davies, S.J., Sweetman, J., Divanach, P. and Chatzifotis, S. 2010b. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquaculture Research* 41, 245-251.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D., Davies, S.J., 2011a. Microbial manipulations to improve fish health and production: a Mediterranean perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 1-16.

- Dimitroglou, A., Reynolds, P., Ravnøy, B., Johnsen, F., Sweetman, J.W., Johansen, J., Davies, S.J., 2011b. The effect of mannan oligosaccharide supplementation on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) fed diets with high levels of plant proteins. *Journal of Aquaculture Research and Development* S1, 011. DOI 10.4172/2155-9556.S1-011.
- Dimitroglou, A., Moate, R., Janssens, T., Spring, P., Sweetman, J.W., Davies, S.J., 2011c. Field observations on the effect of a mannan oligosaccharide on mortality and intestinal integrity of sole (*Solea senegalensis*, Kaup) infected by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Aquaculture Research and Development* S1, 013. DOI 10.4172/2155-9546.S1-013.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S.K., 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: a review. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 62, 130–138.
- Gatesoupe F.J., Zambonino J.L., Cahu, C., Quazuguel, P., 1997. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus Labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 109-114.
- Gatlin, D.M. III, Li, P., Wang, X., Burr, G.S., Castille, F., Lawrence, A.L., 2006. Potential application of prebiotics in aquaculture. In: *Avances en Nutricion Acuicola VIII: VIII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, pp. 371–376.
- Genç, M.A., Yilmaz, E., Genç, E., 2006. Effects of dietary mannan-oligosaccharide on growth, intestine and liver histology of the African catfish (*Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 23, 37–41.
- Genc, M.A., Aktas, M., Genc, E., Yilmaz, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquaculture Nutrition* 13, 156–161.
- Hanley, F., Brown, H., Carbery, J., 1995. First observations on the effects of mannan oligosaccharide added to hatchery diets for warmwater hybrid red tilapia. Poster at the 11th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry, Lexington, KY, USA.
- Irianto, A., Austin, B., 2002a. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25, 333–342.
- Irianto, A., Austin, B. 2002b. Review Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 633-642.
- Kaur T., Bansal M.P., 2006. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. *Nutriciana Hospitalaria* 21, 704-708.
- Kelly, L.A., 1998. Water quality and rainbow trout farming. *Fish Veterinary Journal* 21, 31-45.
- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp.as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235–243.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I: Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition* 16, 504–510.
- Merrifield, D.L., Ringø, E., 2014. *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics, and prebiotics*. Wiley Blackwell publishes electronic formats. First edition. PO19 8SQ, UK. Pp. 500.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198 (3–4), 229–236.
- Pryor, G.S., Royes, J.B., Chapman, F.A., Miles, R.D., 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *North American Journal of Aquaculture* 65, 106–111.
- Sheikholeslami, M., Yusefian, M., Yavari, V., Mohamadian, T., Abhari, H., Goran, H., 2007. Modulation of rainbow trout immune system and enhance resistance against streptococcosis

- using dietary inulin. In: *The First National Conference on Caspian Sea Fisheries Resources*, Gorgan University, Iran, p. 12.
- Sweetman, J.W., Torrecillas, S., Dimitroglou, A., Rider, S., Davies, S.J., Izquierdo, M.S., 2010. Enhancing the natural defences and barrier protection of aquaculture species. *Aquaculture Research* 41, 345–355.
- Tukmechi A., Rahmati Andani H.R., Manaffar R., Sheikhzadeh, N., 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 923-928.
- Tukmechi, A., Bandboni, M., 2014. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on the immune response, hematological parameters, body composition and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology* 30(1), 55-61.
- Yilmaz, E., Genc, M.A., Genc, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 59, 182–188.
- Yousefian, M., Amiri, M.S., 2009. A review of the use of prebiotics in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology* 8, 7313–7318.

The effects of *Saccharomyces cerevisiae* and Mannan-Oligosaccharides based nutritional supplements on Levels of Glucose and Cortisol in Environmental stress and furunculosis in rainbow trout

A. Khodadadi^{*1}, M. al-Sadat Hosseini²

¹Veterinarian, Health and Diseases Specialist in Aquaculture, National Veterinary Organization.

² Veterinarian, Private Sector.

Abstract

The aim of this study is to investigate the effects of complementary rainbow trout diets with different concentrations of prebiotic, which contains active compounds of *Saccharomyces cerevisiae* with mannan-oligosaccharide (MOS) on environmental stress and resistance to furunculosis. Three levels of prebiotic (0, 0.1, 0.5 and 1 %) were mixed into pellets. Fish (19.08±1.45 gr) were fed a supplemented commercial diet for 60 days. On day 60 of study, environmental stress such as hypoxia, hyperthermia and induction of experimental diseases with furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) were also performed for all the experimental groups. The blood glucose levels were determined using an enzymatic-based auto analyzer and used to measure cortisol using cortisol ELISA kit and ELISA method. The results of this study showed that different concentrations in Celmanax have significantly effect on stress and cortisol and glucose levels (P<0.05). The results showed that rainbow trout resistance was increased with different concentrations level of Celmanax® and few fish were suffering to furunculosis (P<0.05). Based on these findings, it could be concluded that in order to decrease and enhance the stress and improve rainbow trout resistance, it is appropriate to add different concentrations level of Celmanax® prebiotic.

Keywords: Environmental Stress, Prebiotics, Furunculosis, Rainbow trout, Stress

*Corresponding authors; aminkhodadadi@gmail.com