شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۱۶-۴۰۷

ارزیابی بررسی اثرات مکمل نوکلئوتیدی جیره و پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی بر شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی و ایمنی سرم خون و بازماندگی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از رویایی با باکتری *Aeromonas hydrophila*

محمود قبادی[۱]، علیرضا میرواقفی*[۲]، حمید فرحمند[۳]

۱. دانش آموخته دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۲/۱۸

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثرات مکمل نوکلوتیدی جیره و پروبیوتیک *P. acidilactici* بر عملکرد رشد، برخی از شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی سرم خون، و همچنین مقاومت در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام گرفت. نه تیمار غذایی حاوی سه سطح از مکمل نوکلوتیدی (۰، ۱ و ۳ گرم بر کیلوگرم غذا) و سه سطح از *P. acidilactici* (۰ و ۰/۱، ۰/۳ گرم بر کیلوگرم غذا) بر اساس طرح فاکتوریل ۳×۳ طراحی شد. هر یک از جیره‌ها به طور تصادفی برای سه گروه (تکرار) ۳۰ تایی از ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزن اولیه ۱/۶۲±۶۳/۴ گرم) در نظر گرفته شد. در پایان دوره هشت هفته‌ای آزمایش، برخی از شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی سرم خون شامل پروتئین کل، لیزوزیم، مسیر فرعی سیستم کمپلمان (ACH_{50})، کلسترول، تری گلیسیرید، گلوکز، آلبومین و گلوبولین، و همچنین شاخص‌های رشد شامل بازماندگی، میانگین افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد میزان لیزوزیم و ACH_{50} در تیمارهای آزمایشی، تحت تاثیر متقابل بین مکمل نوکلوتیدی و *P. acidilactici* به طور معنی داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که اثر متقابل مکمل نوکلوتیدی و *P. acidilactici* بر میزان پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسیرد، گلوکز، آلبومین و گلوبولین، معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$)؛ اما به‌طور معنی‌داری موجب بهبود شاخص‌های رشد گردید. به‌علاوه، در پایان دوره آزمایش، ۱۰ عدد ماهی از هر تکرار به صورت داخل صفاقی با سوسپانسیون باکتری آئروموناس هیدروفیلا ($۳/۵\times۱۰^{۷}$ cfu/ml) برای تعیین مقاومت در برابر بیماری مورد تزریق قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مکمل کردن جیره غذایی ماهی قزل آلا با مکمل نوکلوتیدی و *P. acidilactici*، به‌طور قابل ملاحظه‌ای مقاومت در برابر عفونت باکتری آئروموناس هیدروفیلا را افزایش داد و بالاترین مقاومت در تیمارهای تعاملی (نوکلوتید×*P. acidilactici*) مشاهده شد. به طور کلی ترکیب مکمل نوکلوتیدی و *P. acidilactici*، اثرات سودمند به مراتب بیشتری از استفاده هر یک از آن‌ها به صورت مجزا نشان داد. همچنین، بهترین ترکیب از آن‌ها، ترکیب $۳\ g\ kg^{-1}$ از مکمل نوکلوتیدی و $۰/۱\ g\ kg^{-1}$ از *P. acidilactici* به‌دست آمد.

واژگان کلیدی: مکمل نوکلوتیدی جیره، *P. acidilactici*، قزل آلای رنگین کمان، پاسخ‌های ایمنی، مقاومت در برابر بیماری.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۲۶۳۲۲۲۳۰۴۴+ ایمیل: avaghefi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

در بین محرک‌های ایمنی مورد بررسی در آبزی پروری، مکمل نوکلئوتیدی جیره در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده است. با توجه به تحقیقات انجام شده در موجودات مختلف، نوکلئوتید جیره دارای نقش‌های متابولیک متعددی از جمله بهبود شاخص‌های ایمنی بدن (ذاتی و اکتسابی)، افزایش رشد، توسعه میکروفلور روده، بهبود نتاج حاصله از مولدین، افزایش مقاومت به بیماری، افزایش سطح جذب دستگاه گوارش، موثر بودن در متابولیسم چربی و پروتئین، افزایش جذب آهن در روده، بهبود پاسخ‌های استرس، افزایش ظرفیت تنظیم اسمزی، افزایش تاثیر واکسن، کاهش تخریب DNA ناشی از توکسین ها، کاهش ضایعات کبدی و اصلاح عملکرد کبد و بیان ژن شاخص‌های ایمنی است.

گروه دیگر از محرک‌های ایمنی مورد استفاده در آبزی‌پروری، پروبیوتیک‌ها هستند. از مزایای پروبیوتیک‌ها می‌توان به مواردی از قبیل دفع رقابتی به‌صورت ممانعت از کلنی‌سازی عوامل بیماری‌زا در دستگاه گوارش و یا رقابت بر سر فضا، غذا و اکسیژن با باکتری بیماری‌زا، بهبود مصرف غذا از طریق تحریک اشتها و یا شکستن ترکیبات غیر قابل هضم موجود در جیره به‌وسیله آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز و همچنین تولید ویتامین‌هایی مانند بیوتین و ریبوفلاوین، افزایش رشد و بقا و افزایش ایمنی سلولی و هومورال در میزبان از طریق تولید ترکیبات ممانعت کننده و غیره اشاره کرد (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ماهی و شرایط پرورش

برای انجام تحقیق حاضر، تعداد ۸۱۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان از یکی از مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا واقع در منطقه الموت قزوین تهیه شد. ماهی‌ها با استفاده از تانکر مخصوص حمل ماهی (مجهز به کپسول اکسیژن) به محل انجام تحقیق (کارگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران) منتقل شدند. پس از انتقال، ماهی‌ها در تانک‌های ۱۰۰۰ لیتری رهاسازی شده و بلافاصله با محلول نمک ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند. همچنین ماهی‌ها از لحاظ وجود انگل‌های خارجی و بیماری‌های احتمالی، مورد ارزیابی قرار گرفته و به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاه سازش یافتند. در طول دوره سازگاری، ماهی‌ها سه نوبت در روز با جیره غذایی پایه (فاقد مکمل نوکلئوتیدی و پروبیوتیکی) تغذیه شدند. پس از دوره سازش، ماهی‌ها به ۲۷ گروه ۳۰تایی تقسیم شده و پس از وزن کشی هر گروه به تانک‌های جداگانه ۶۰۰ لیتری منتقل شدند. دما، اکسیژن محلول و pH آب به صورت روزانه با استفاده از دستگاه سنجش کیفیت آب YSI (مدل 556 MPS، آمریکا) اندازه‌گیری و ثبت شد که میانگین آن‌ها به‌ترتیب ۱۴±۱/۲°C، ۷/۹±۰/۳ $mg\ L^{-1}$ و ۷/۳±۰/۱ بود.

۲.۲. طرح آزمایش و نحوه تیماربندی

در این مطالعه سه سطح ۰، ۱ و ۳ گرم بر کیلوگرم غذا برای مکمل نوکلئوتید (طهماسبی-کوهیانی و همکاران، ۲۰۱۱) و سه سطح ۰، ۰/۱ و ۰/۳ گرم بر کیلوگرم غذا نیز برای مکمل پروبیوتیکی (Merrifield *et al.*, 2011) و بر مبنای طرح آماری فاکتوریل (۳×۳) در نظر گرفته شد. بنابراین آزمایش به صورت طرح فاکتوریل و دارای مجموعاً نه تیمار بوده که با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر تیمار، مجموعاً ۲۷ واحد آزمایش داشت. هر تکرار شامل ۳۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۱/۶۲±۶۳/۴ گرم بود. آزمایش هشت هفته به طول انجامید و در این مدت ماهی‌ها سه مرتبه در روز با جیره‌های آزمایشی به‌صورت دستی و در حد سیری تغذیه شدند. بعد از اتمام دوره هشت هفته‌ای پرورش، از هر مخزن تعداد کافی ماهی جهت اندازه گیری تست‌های مربوطه برداشت خواهد شد.

۳.۲. آماده سازی جیره

از آنجایی که سطح بهینه پروتئین، کربوهیدرات و چربی در جیره‌های غذایی ماهیان قزل آلای رنگین کمان در رشد مطلوب آن‌ها نقش به‌سزایی دارد، بنابراین از غذای پیش ساخته GFT1 شرکت فرادانه، شهرکرد، ایران استفاده شد. این جیره بدون هیچ تغییری به‌عنوان جیره پایه مورد مصرف قرار گرفت. برای تهیه جیره حاوی مکمل‌های نوکلئوتید و

پروبیوتیک، از روش شرح داده شده توسط Merrifield و همکاران (۲۰۱۱) استفاده گردید.

۴.۲. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف

۴،۱.۲. سنجش فاکتورهای رشد

تمامی ماهی‌های هر یک از واحدهای آزمایش در پایان دوره هشت هفته‌ای پرورش و بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی، وزن‌کشی و فاکتورهای رشد شامل میزان افزایش وزن بدن (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و درصد بازماندگی، با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Misra *et al.*, 2006):

رابطه ۲-۱: میانگین وزن اولیه (گرم) - میانگین وزن ثانویه (گرم) = افزایش وزن بدن

رابطه ۲-۲: افزایش وزن بدن(گرم)/ مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

رابطه ۲-۳: ۱۰۰ × (دوره پرورش به روز / (Ln W2 – Ln W1) = ضریب رشد ویژه

رابطه ۲-۴: ۱۰۰× (تعداد اولیه- تعداد نهایی) = درصد بازماندگی

۴،۲.۲. فاکتورهای بیوشیمیایی خون

۴،۲،۱.۲. اندازه گیری غلظت پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم

از نمونه سرم باقیمانده به‌منظور تعیین میزان پروتئین کل به‌روش بیورت و تعیین غلظت آلبومین به روش برموکرزول گرین، با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون انجام شد. عدد به‌دست آمده نیز از فرمول زیر محاسبه گردید (Kumar *et al.*, 2005).

رابطه ۲-۵: جذب نمونه × ۶ = استاندارد جذب

میزان گلوبولین سرم با کم کردن پروتئین کل سرم از آلبومین سرم محاسبه می‌گردد (Kumar *et al.*, 2005).

رابطه ۲-۶: میزان آلبومین سرم - پروتئین کل سرم = میزان گلوبولین سرم

۴،۲،۲.۲. اندازه‌گیری کلسترول، گلوکز و تری-گلیسیرید

بدین منظور نمونه‌های سرم جداسازی شده با استفاده از کیت‌های آزمایشی شرکت پارس آزمون مخصوص هر یک از شاخص‌ها و بر اساس دستورالعمل-های شرکت سازنده، و با استفاده از دستگاه الایزا، مورد استفاده قرار گرفتند.

۴،۳.۲. بررسی فعالیت لیزوزیمی

فعالیت لیزوزیم سرم با روش ارائه شده توسط Misra و همکاران (۲۰۰۶) با مختصر تغییرات انجام شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر سرم با ۷۵۰ میکروگرم در میلی لیتر باکتری *Micrococcus lysodeikticus* لئوفیلیزه (سیگما) تهیه شده در بافر فسفات سیترات ۰/۱ مولار، pH=۸/۵ در گودهای پلیت الیزای ۹۶ خانه ای مخلوط گردید. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر در ۴ و ۹ دقیقه بعد قرائت شد. مقداری از سرم که سبب کاهش در میزان جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه شده به‌عنوان یک واحد فعالیت لیزوزیم در نظر گرفته شده و با واحد در لیتر نشان داده شد.

۴،۴.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم (ACH_{50})

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان مطابق با روش شرح داده شده توسط Sunyer و Tort (۱۹۹۵) اندازه گیری گردید. به‌طور خلاصه، ۵۰۰ میکرولیتر سرم در بافر EGTA ژلاتین ورونال منیزیم‌دار به‌طور متوالی رقیق گردید. ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفندی (۲×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر) به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فعالیت همولیز با اضافه نمودن بافر ۱۰ میلی مول EGTA ژلاتین ورونال منیزیم‌دار متوقف گردید. بعد از سانتریفیوژ، میزان همولیز از روی جذی نوری مایع بالایی در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

۵.۲. چالش باکتریایی

برای آزمایش چالشی طبق روش Yarahmadi و همکاران (۲۰۱۴) عمل شد. به طور خلاصه بر اساس این روش، آ.هیدروفیلای زنده در ۰/۱ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی فسفات (PBS) (۳/۵ × ۱۰^{۷} cfu/ml) برای

جدول ۱- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های عملکردی (رشد و بازماندگی) ماهی قزل آلای رنگین کمان

تیمار	سطح مکمل ($g\ kg^{-1}$)		شاخص‌های عملکردی ماهی			
	P. acidilactici	نوکلوتید	درصد بازماندگی (٪)	افزایش وزن بدن (گرم)	ضریب رشد ویژه ($\%\ d^{-1}$)	ضریب تبدیل غذایی
۱	۰	۰	۹۳/۳۳±۱/۹۲	۸۰/۸۲±۳/۷۷^{a}	۱/۴۶±۰/۰۵^{a}	۱/۵۹±۰/۰۹^{e}
۲	۰	۱	۹۷/۷۸±۱/۱۱	۱۰۷/۱۳±۱/۲۶^{c}	۱/۷۶±۰/۰۳^{c}	۱/۴۰±۰/۰۱^{cd}
۳	۰	۳	۹۴/۴۴±۴/۰۱	۱۲۳/۹۳±۵/۲۰^{d}	۱/۹۴±۰/۰۶^{d}	۱/۲۵±۰/۰۱^{bc}
۴	۰/۱	۰	۹۵/۵۶±۲/۹۴	۱۰۵/۳۰±۳/۱۷^{c}	۱/۷۵±۰/۰۲^{c}	۱/۳۶±۰/۰۸^{cd}
۵	۰/۱	۱	۹۶/۶۷±۱/۹۲	۱۳۳/۰۹±۴/۱۵^{d}	۲/۰۳±۰/۰۴^{de}	۱/۱۶±۰/۰۴^{ab}
۶	۰/۱	۳	۹۳/۳۳±۳/۸۵	۱۴۸/۲۵±۷/۲۱^{e}	۲/۱۵±۰/۰۸^{e}	۱/۰۵±۰/۰۲^{a}
۷	۰/۳	۰	۹۱/۱۱±۲/۹۴	۹۱/۰۹±۳/۸۱^{ab}	۱/۵۹±۰/۰۴^{ab}	۱/۴۷±۰/۰۴^{de}
۸	۰/۳	۱	۹۵/۶۵±۲/۲۲	۹۴/۴۲±۲/۷۰^{bc}	۱/۶۲±۰/۰۳^{bc}	۱/۴۸±۰/۰۴^{de}
۹	۰/۳	۳	۹۳/۳۳±۱/۹۲	۹۶/۶۵±۳/۹۱^{bc}	۱/۶۵±۰/۰۳^{bc}	۱/۵۰±۰/۰۷^{de}
آنالیز واریانس دو طرفه						
اثر اصلی نوکلوتید			ns	***	***	***
اثر اصلی *P. acidilactici*			ns	***	***	***
اثر متقابل			ns	**	**	*

کلیه داده‌ها به‌صورت میانگین SEM ± بیان شده‌اند. نتایج با حروف انگلیسی متفاوت در ستون‌های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در بین تیمارها می‌باشند ($P<۰/۰۵$) (در قسمت آنالیز واریانس دو طرفه، ns: عدم اختلاف معنی‌داری، *** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱، *** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، *** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد).

تست چالشی استفاده گردید. در پایان آزمایش، ۳۰ ماهی از هر تیمار (۱۰ عدد از هر تکرار) با آ. هیدروفیلا در داخل صفاق تزریق شده و درصد بازماندگی بیشتر از سه هفته بعد از چالش محاسبه و ثبت گردید.

۶.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق در قالب طرح فاکتوریل، برنامه‌ریزی و اجرا گردید. ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها به‌وسیلهٔ آزمون Leven تست شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس دو طرفه (Two Way ANOVA) انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار SPSS (v۲۳) برای آنالیز آماری و از (۲۰۰۷) Excel برای رسم نمودارها استفاده شد. برای تبدیل داده های درصدی به داده های نرمال از arcsin استفاده گردید.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های رشد

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های عملکردی (رشد و بازماندگی) ، در جدول ۱ آورده شده است. در پایان دوره آزمایش هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد بازماندگی بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (جدول ۱). همه ماهیان به خوبی رشد کرده و هیچ علامتی از بیماری و یا تغییر رفتار ظاهری در آن‌ها مشاهده نگردید. آنالیز واریانس دو طرفه نتایج، نشان داد که اثر اصلی نوکلوتید، اثر اصلی *P. acidilactici* و همچنین اثر متقابل آن‌ها، بر شاخص‌های رشد بین تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۱). همچنین تیمار ۶ بهترین عملکرد را از نظر میانگین افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی به ترتیب با مقدار ۱۴۸/۲۵±۷/۲۱ گرم، ۲/۱۵±۰/۰۸ و ۱/۰۵±۰/۰۲ داشت که با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$).

۲.۳. شاخص‌های بیوشیمیایی خون

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از دوره هشت هفته‌ای آزمایش، در جدول ۲ آورده شده است. در پایان دوره آزمایش، آنالیز واریانس دو طرفه نتایج نشان داد که اثر متقابل نوکلوتید و پروبیوتیک بر مقدار پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید در تیمارهای مختلف آزمایشی، معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$)؛

جدول ۲- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای رنگین کمان.

تیمار	سطح مکمل ($g\ kg^{-1}$)		شاخص‌های بیوشیمیایی خون					
	P. acidilactici	نوکلوتید	پروتئین کل (گرم در لیتر)	آلبومین (گرم در لیتر)	گلوبولین کل (گرم در لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم در دسی لیتر)	تری گلیسرید (میلی‌گرم در دسی لیتر)	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)
۱	۰	۰	۳۴/۵۰±۲/۲۲^{a}	۷/۹۶±۰/۵۱^{a}	۲۶/۵۵±۱/۷۱^{a}	۶۷/۵۴±۳/۷۸	۴۵۹/۷۱±۱۷/۳۴	۴۸/۱۲±۱/۳۱^{a}
۲	۰	۱	۳۷/۱۸±۱/۸۱^{abc}	۸/۵۷±۰/۴۲^{abc}	۲۸/۶۱±۱/۴۰^{abc}	۷۲/۳۰±۵/۲۷	۴۶۱/۷۴±۵/۷۷	۵۷/۰۱±۰/۷۱^{b}
۳	۰	۳	۴۰/۳۷±۰/۷۷^{bcd}	۹/۳۱±۰/۱۸^{bcd}	۳۱/۰۶±۰/۵۹^{bcd}	۷۳/۲۸±۳/۳۱	۴۹۱/۹۷±۲۵/۸۰	۵۶/۳۸±۱/۵۶^{b}
۴	۰/۱	۰	۳۶/۳۳±۲/۰۸^{ab}	۸/۳۸±۰/۴۸^{ab}	۲۷/۹۶±۱/۶۰^{ab}	۷۰/۸۹±۶/۴۲	۴۵۴/۵۵±۱۱/۰۰	۵۶/۱۲±۱/۳۶^{b}
۵	۰/۱	۱	۴۱/۹۳±۱/۳۶^{cd}	۹/۶۷±۰/۳۱^{cd}	۳۲/۲۷±۱/۰۵^{cd}	۸۱/۰۷±۴/۲۳	۴۸۱/۰۷±۱۳/۸۷	۵۷/۳۶±۲/۷۰^{b}
۶	۰/۱	۳	۴۵/۲۶±۰/۸۷^{de}	۱۰/۴۴±۰/۲۰^{de}	۳۴/۸۳±۰/۶۷^{de}	۷۵/۳۸±۶/۹۴	۴۹۷/۸۶±۲۱/۱۰	۵۷/۵۲±۴/۵۳^{b}
۷	۰/۳	۰	۴۰/۰۳±۱/۷۵^{bcd}	۹/۲۳±۰/۴۰^{bcd}	۳۰/۸۰±۱/۳۵^{bcd}	۷۴/۸۱±۴/۴۶	۴۴۲/۱۷±۳۲/۰۲	۵۱/۴۲±۱/۳۲^{ab}
۸	۰/۳	۱	۴۳/۴۵±۲/۱۳^{de}	۱۰/۰۲±۰/۴۹^{de}	۳۳/۴۳±۲/۶۴^{de}	۶۹/۴۷±۵/۶۰	۴۳۳/۸۲±۳۵/۷۸	۵۲/۷۴±۱/۲۰^{ab}
۹	۰/۳	۳	۴۸/۳۵±۱/۱۱^{e}	۱۱/۱۵±۰/۲۶^{e}	۳۷/۲۱±۰/۸۵^{e}	۷۸/۴۶±۴/۱۴	۴۴۶/۳۴±۵/۶۴	۵۳/۴۶±۱/۵۸^{b}
آنالیز واریانس دو طرفه								
اثر اصلی نوکلوتید			***	***	***	ns	ns	*
اثر اصلی *P. acidilactici*			***	***	***	ns	ns	*
اثر متقابل			ns	ns	ns	ns	ns	ns

کلیه داده ها به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده‌اند. نتایج با حروف انگلیسی متفاوت در ستون‌های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در بین تیمارها می-باشند ($P<0/05$). در قسمت آنالیز واریانس دو طرفه، ns: عدم اختلاف معنی‌داری، *** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱، ** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، * : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

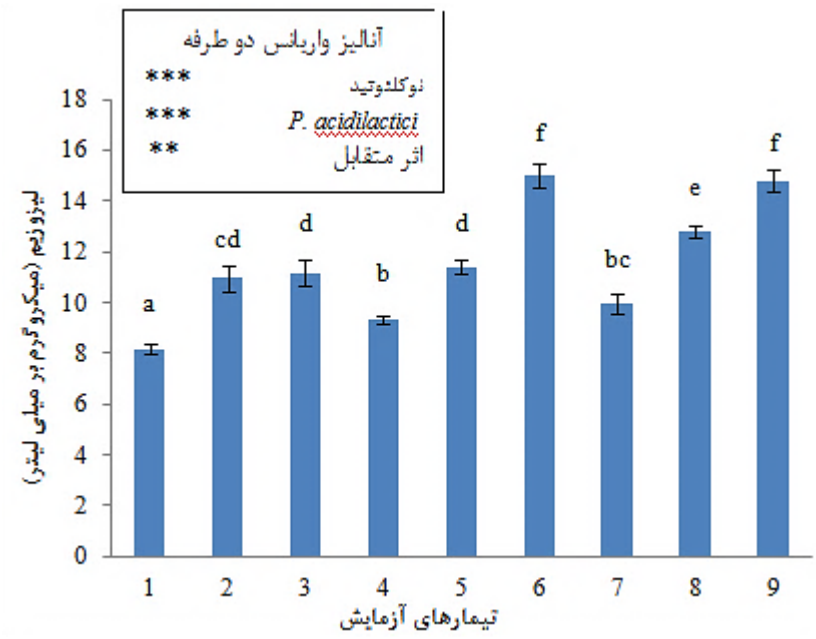
ولی اثر اصلی نوکلوتید و اثر اصلی پروبیوتیک (*P. acidilactici*) بر شاخص های پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین ($P<0/001$) و مقدار گلوکز ($P<0/05$) معنی‌دار بود و موجب ایجاد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی گردید (جدول ۲).

۳.۳. لیزوزیم

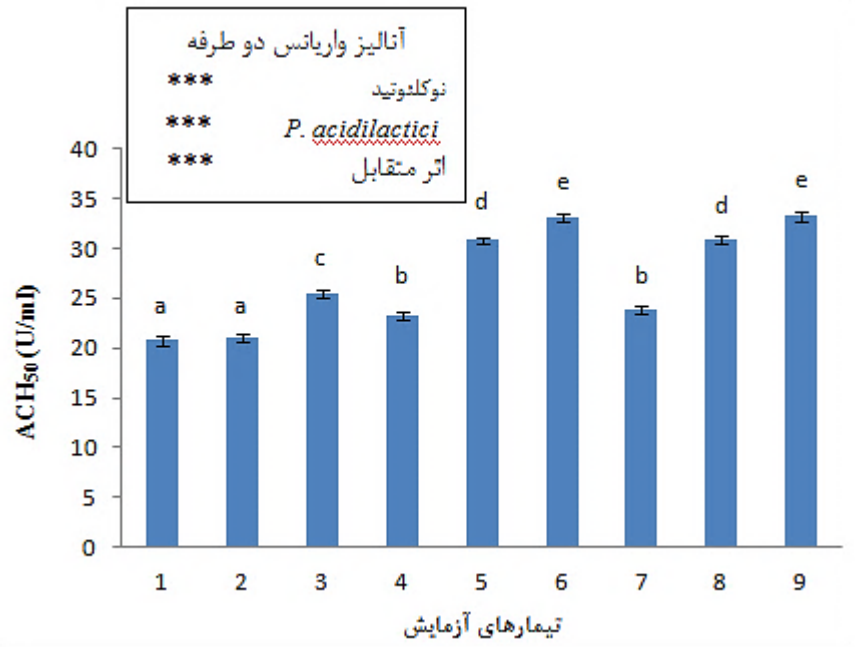
نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان لیزوزیم ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از دوره هشت هفته‌ای آزمایش، در نمودار ۱ آورده شده است. آنالیز واریانس دو طرفه نتایج نشان داد که اثر اصلی نوکلوتید، اثر اصلی *P. acidilactici* و همچنین اثر متقابل آن‌ها، اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم سرم بین تیمارهای آزمایشی موجب شد. آزمون مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که ماهی های تغذیه شده با نوکلوتید، پروبیوتیک *P. acidilactici* و یا هر دو به طور همزمان، افزایش معنی‌داری قابل ملاحظه‌ای از لحاظ میزان لیزوزیم سرم نسبت به گروه شاهد داشتند ($P<0/05$) (نمودار ۱). بیشترین میزان لیزوزیم، در تیمارهای ۶ و ۹ به ترتیب با مقدار ۱۵/۰۱±۰/۵۰ و ۱۴/۸۱±۰/۴۱ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد که اختلاف آن‌ها با سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار بود ($P<0/05$) و با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0/05$) (نمودار ۱). کمترین میزان نیز در تیمار ۱ (شاهد) با مقدار ۸/۱۷±۰/۲۱ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد که با سایر تیمارهای آزمایش اختلاف آن معنی‌دار بود ($P<0/05$) (نمودار ۱).

۴.۳. فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (ACH_{50})

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان ماهی قزل آلای رنگین کمان بعد از دوره هشت هفته‌ای آزمایش، در نمودار ۲ آورده شده است. آنالیز واریانس دو طرفه نتایج نشان داد که اثر اصلی نوکلوتید، اثر اصلی *P. acidilactici* و همچنین اثر متقابل آن‌ها، موجب اختلاف معنی‌داری میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم بین تیمارهای آزمایشی شد ($P<0/001$). آزمون مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که ماهی‌های تغذیه شده با نوکلوتید، پروبیوتیک *P. acidilactici* و یا هر دو به طور همزمان، افزایش معنی‌داری قابل ملاحظه‌ای از لحاظ میزان لیزوزیم سرم نسبت به گروه شاهد داشتند ($P<0/05$) (نمودار ۲). بیشترین میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان، در تیمارهای ۶ و ۹ به ترتیب با مقدار ۳۳/۱۵±۰/۴۵ و ۳۳/۲۳±۰/۴۶ U/ml مشاهده



نمودار ۱ – میزان لیزوزیم سرم در ماهیان قزل آلای تغذیه شده با جیره‌ای آزمایشی پس از یک دوره هشت هفته‌ای. کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± SEM بیان شده‌اند. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در بین تیمارها می‌باشند (P<۰/۰۵). در قسمت آنالیز واریانس دو طرفه، * : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ و ** : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ می‌باشد.**

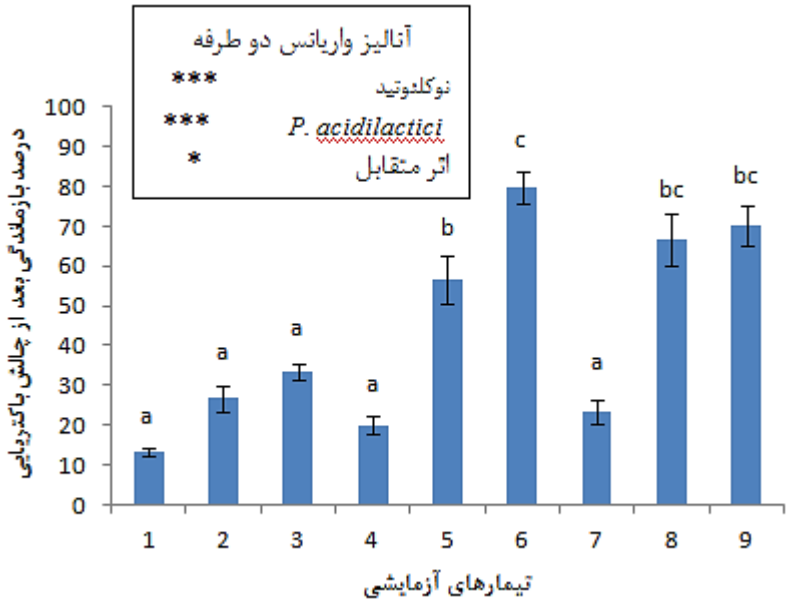


نمودار ۲ – میزان ACH_{50} در ماهیان قزل آلای تغذیه شده با جیره‌ای آزمایشی پس از یک دوره هشت هفته‌ای. کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± SEM بیان شده‌اند. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در بین تیمارها می‌باشند (P<۰/۰۵). در قسمت آنالیز واریانس دو طرفه، * : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ می‌باشد.**

شد که اختلاف آن‌ها با سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$) (نمودار ۲). کمترین میزان نیز در تیمار ۱ (شاهد) با مقدار ۲۰/۷۵±۰/۵۲ U/ml مشاهده شد که با سایر تیمارهای آزمایش به‌جز تیمار ۲ اختلاف آن معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

۵.۳. چالش باکتریایی

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان بازماندگی ماهی قزل آلای رنگین کمان سه هفته پس از رویارویی با باکتری *A. hydrophila*، در نمودار ۳ آورده شده است. آنالیز واریانس دو طرفه نتایج نشان



نمودار ۳ - تاثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان بازماندگی ماهی قزل آلای رنگین کمان سه هفته پس از رویارویی با باکتری *A. hydrophila* کلیه داده‌ها به‌صورت میانگین ±SEM بیان شده‌اند. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در بین تیمارها می‌باشند ($P<0/05$). در قسمت آنالیز واریانس دو طرفه، * : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ و * : اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد**

داد که اثر اصلی نوکلوتید، اثر اصلی *P. acidilactici* ($P<0/001$) و همچنین اثر متقابل آن‌ها ($P<0/05$)، موجب اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی بر میزان بازماندگی بعد از چالش باکتریایی گردید (نمودار ۳). بیشترین میزان بازماندگی بعد از چالش باکتریایی، مربوط به تیمار ۶ با ۵/۷۷±۸۰/۰ درصد و کمترین میزان نیز در تیمار ۱ (شاهد) با مقدار ۳/۳۳±۱۳/۳ درصد بود ($P<0/05$) (نمودار ۳).

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از مکمل نوکلئوتیدی و پروبیوتیک *P. acidilactici* به طور معنی‌داری باعث بهبود شرایط رشد از جمله افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید. این نتایج با یافته‌ها و گزارش‌های ارائه شده در مطالعات پیشین در خصوص استفاده مجزا از پروبیوتیک‌ها و مکمل نوکلئوتیدی در جیره غذایی انواع آبزیان همخوانی دارد (Li and Gatlin, 2006; Akhter *et al.*, 2015). بهبود شاخص‌های رشد می‌تواند به دلیل نقش پروبیوتیک‌ها در اصلاح فلور میکروبی روده باشد. زیرا اثبات شده است که باکتری‌های مفید دستگاه گوارش با تولید آنزیم‌ها و مواد متابولیکی باعث تسهیل هضم و جذب غذا و افزایش ارزش غذایی آن و کاهش مصرف انرژی می‌گردند (Akhter *et al.*, 2015).

شاخص‌های بیوشیمیایی خون در ماهیان می‌تواند متأثر از مواردی چون گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و شرایط تغذیه‌ای باشد؛ بنابراین، مطالعه فراسنجه‌های خونی اطلاعات ارزشمندی برای ارزیابی سلامتی ماهی فراهم می‌کند (Yousefi *et al.*, 2012). ولی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان کلسترول و تری گلیسیرید در بچه ماهیان سفید تغذیه شده با پروبیوتیک تغییری نکرد ولی گلوکز افزایش داشت. همچنین طهماسبی و همکاران (۲۰۱۱)، نتایج مشابهی از اثر استفاده از نوکلئوتید بر شاخص‌های میزان کلسترول، تری گلیسیرید و گلوکز گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

میزان پروتئین کل سرم، شاخص مهمی از وضعیت سلامت ماهیان استخوانی و نیز به عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شوند (Kiron, 2012). گزارش شده محرک‌های ایمنی معمولا بر روی سطح پروتئین کل سرم و اجزای تشکیل دهنده آن (آلبومین و گلوبولین) تأثیر می‌گذارند (Sakai *et al.*, 2001). در تحقیقی توسط لی و

همکاران (۲۰۰۴)، هیبرید ماهی باس راه‌راه هشت هفته با ۰/۵ درصد مکمل نوکلئوتیدی جیره تغذیه شد و در انتهای دوره چالش باکتریایی با باکتری *Streptococcus iniae* صورت گرفت. با بررسی شاخص میزان پروتئین سرم، تغییر معناداری در بین گروه تیمار و کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) که نتیجه آن با تحقیق حاضر همسو می‌باشد.

در اغلب جانوران، آنزیم لیزوزیم بخشی از سیستم دفاع غیراختصاصی را تشکیل می‌دهد و نقش اساسی در ایمنی ذاتی به وسیله تجزیه دیواره سلول باکتری و در نتیجه تحریک فاگوسیتوز باکتری‌ها بازی می‌کند (Ellis, 1990). فعالیت لیزوزیمی ماهیان قزل آلای رنگین کمان که با ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد نوکلئوتید تغذیه شده بود، با افزایش دز نوکلئوتیدی مورد مصرف، میزان فعالیت افزایش نشان داد (Tahmasebi-Kohyani *et al.*, 2011). همچنین Tukmechi و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان با غلظت‌های متفاوت *Lactobacillus delbrueckii* سبب افزایش میزان لیزوزیم سرم در سطح معنی‌داری ۵ درصد نسبت به گروه شاهد شد. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر در خصوص افزایش فعالیت لیزوزیمی در اثر استفاده از نوکلئوتیدها و پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی انواع آبزیان همخوانی دارد.

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان یکی از مهمترین شاخص‌های دفاع غیر اختصاصی در ماهی است. فعال شدن این سیستم باعث تحریک دفاع سلولی می‌شود. افزایش فعالیت سیستم کمپلمان نشان دهنده فعال شدن سیستم ایمنی است (Lambris, Holland and 2002). مطالعات پیشین افزایش میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در اثر استفاده از نوکلئوتیدها و پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی انواع آبزیان را گزارش کرده‌اند (Tahmasebi-Kohyani *et al.*, 2011; Yarahmadi *et al.*, 2014; Hoseinifar *et al.*, 2015)، که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد.

به طور خلاصه دو مسیر اصلی تخمیر هگزوز (مسیر امبدن - میرهوف و مسیر انتنر - دودروف) در باکتری‌های اسید لاکتیک وجود دارد. به طور خلاصه، مسیر امبدن-میرهوف مجموعه‌ای از واکنش‌های درون یاخته‌ای است که توسط آن یک مولکول گلوکز به دو مولکول سه کربنه پیروات شکسته می‌شود و بخشی از انرژی آزاد گلوکز برای تشکیل دو مولکول ATP و دو مولکول NADH به مصرف می‌رسد. بسیاری از باکتری‌های بی‌هوازی کاملاً به مسیر امبدن - میرهوف وابسته‌اند. در بین باکتری‌های اسید لاکتیک نیز، دسته هومولاکتیک که شامل جنس‌های *Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus* می‌باشد از مسیر امبدن - میرهوف پیروی می‌کنند. بنابراین طبق توضیحات فوق، نقش مولکول NADH در چرخه انرژی در باکتری *Pedicoccus acidlactici* بسیار پر اهمیت است و از آنجایی که نوکلئوتیدها به عنوان اجزای سازنده‌ی چندین کوآنزیم از قبیل نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD)، نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADP)، نقش اساسی دارد، بنابراین در صورت اضافه کردن مکمل نوکلئوتیدی در جیره حاوی پروبیوتیک *Pedicoccus acidlactici*، این نوکلئوتید می‌تواند در مسیر متابولسیم این باکتری در ساخت نیکوتین-آمید آدنین دی‌نوکلئوتید مورد استفاده قرار گیرد و این فرصت برای این پروبیوتیک ایجاد شود که به فلور غالب روده تبدیل شود.

References

Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173, 111-133

Kumar, S., Sahu, N., Pal, A., Choudhury, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S., 2005 .Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 331-344.

Li, P., Gatlin, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251, 141-152.

Li, P., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Gatlin, D.M., 2007. Preliminary evaluation of a purified nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 38, 890- 887.

Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., Secombes, C., 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture* 221, 23-40.

Merrifield, D., Bradley, G., Harper, G., Baker, R., Munn, C., Davies, S., 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Aquaculture Nutrition* 17, 73-79.

Metailler, R., Cadena-Roa, M., Ruyet, J., 1983. Attractive chemical substances for the weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*): qualitative and quantitative approach. *Journal of the World Mariculture Society* 14, 679-684.

Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary [beta]-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture* 255, 82-94.

Ramadan, A., Afifi, N.A., Moustafa, M., Samy, A., 1994. The effect of ascogen on the immune response of tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Fish and shellfish Immunology* 4, 159-165.

Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H., Tabata, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 24, 433-438.

Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream Sparus aurata serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopatholog*. 45, 333-345.

Tahmasebi-Kohyani, A., Keyvanshokooh, S., Nematollahi, A., Mahmoudi, N., Pasha-Zanoosi, H., 2011. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 189-193.