View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

بهبود شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده توام از ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus*

امیر توکمه‌چی[۱]*؛ حسین شمسی[۲]؛ سعید مشکینی[۳]؛ رضا دلشاد[٤] و احد قاسمی مغانجوقی[٥]
atokmachi@gmail.com
۱- گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه صندوق پستی: ۱٦٥٦-٥٧١٥٣
۲- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه صندوق پستی: ۱٦٥٦-٥٧١٥٣
۳ - گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه صندوق پستی: ۱٦٥٦-٥٧١٥٣
٤- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه صندوق پستی: ۹٦۹
٥- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه صندوق پستی: ۹٦۹

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۱

چکیده

به منظور بررسی تأثیر تغذیه‌ای ویتامین C و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) بر شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۴۸۰ عدد ماهی با وزن متوسط (± انحراف معیار) ۵±۶۸ گرم از یکی از مزارع پرورشی ارومیه تهیه گردید. پس از طی دوران سازگاری ماهیان در قالب چهار گروه به مدت چهار هفته بترتیب با جیره‌های آزمایشی شامل: غذای کنسانتره عادی (گروه یک)، غذای کنسانتره حاوی یک گرم در کیلوگرم ویتامین C (گروه دوم)، غذای کنسانتره حاوی یک گرم ویتامین C و *Lactobacillus rhamnosus* به میزان $CFU۵\times۱۰^{۷}$ در هر کیلو (گروه سوم) و غذای کنسانتره حاوی *Lactobacillus rhamnosus* به میزان $CFU۵\times۱۰^{۷}$ بر گرم (گروه چهارم) مورد تغذیه قرار گرفتند. سپس همه گروه‌ها به مدت دو هفته دیگر با جیره عادی تغذیه شدند. زیست سنجی در روز ۳۰ مطالعه انجام شد و هر دو هفته یکبار خونگیری ماهیان برای سنجش پارامترهای ایمنی شامل فعالیت لیزوزیم، فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم و مقدار آنتی بادی تام پلاسما صورت گرفت. نتایج نشان داد که استفاده توام ویتامین C و پروبیوتیک قادر است شاخص‌های رشد ماهی قزل آلای رنگین کمان را بطور معنی‌داری افزایش دهد. همچنین فعالیت لیزوزیم سرم و راه میانبر کمپلمان به طور معنی داری در ماهیان گروه سوم (استفاده توام ویتامین C و پروبیوتیک) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. مقدار آنتی بادی کل پلاسمای ماهیان گروه سوم در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ مطالعه بیشتر از مقادیر آن در سایر گروه‌ها بود ولی فقط در روز ۳۰ مطالعه اختلاف آماری معنی دار را با سایر گروه‌ها نشان داد. براساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت که استفاده توام ویتامین C و *Lactobacillus rhamnosus* می‌تواند شاخص‌هایی نظیر وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه و پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل آلا (فعالیت لیزوزیم، فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم و مقدار آنتی بادی تام پلاسما) را بهبود ببخشد، اما برای بدست آوردن نتایج بهتر انجام مطالعات میدانی بیشتر لازم است.

لغات کلیدی: تغذیه، ترکیبات خونی، غذای مکمل، خصوصیات زیستی

*نویسنده مسئول

مقدمه

استفاده از میکروارگانیزم‌های مفید (پروبیوتیک‌ها) در جیره غذایی آبزیان یکی از راههای افزایش امنیت بهداشتی مزارع پرورشی است. افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تحریک اشتها (Irianto & Austin, 2002)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساخت ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی و افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی می‌شود (Gatesoupe, 1999; Liu *et al*., 2010).

یکی دیگر از راههای پیشگیرانه در زمینه مدیریت بهداشتی مزارع پرورش ماهی استفاده از محرک‌های طبیعی و غیرزنده سیستم ایمنی است. از جمله این مواد که به عنوان محرک سیستم ایمنی نیز مطرح است ویتامین C می‌باشد (Montero *et al*., 1999). افزودن ویتامین C به جیره غذایی سبب افزایش مقاومت موجود در برابر استرس‌های محیطی مانند تراکم، کمبود اکسیژن، سموم، کمبودهای غذایی، نوسانات دمایی، بیماری‌ها و نیز بهبود سریعتر زخم‌ها می‌شود. همچنین با تقویت سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش مقاومت بدن، در نهایت منجر به افزایش تولید در مزارعِ پرورشی می‌گردد (Dabrowski, 2001).

جعفریان و همکاران (۱۳۹۰) ثابت کردند که رشد و بقاء لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر استرس‌های شوری، حرارت بالا، قلیائیت و اسیدیته پس از تغذیه با پروبیوتیک‌های باسیلوس مستخرج از روده ماهیان خاویاری بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. ناصری و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis* در سطوح مختلف می‌توانند بطور معنی‌داری شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مانند وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و نسبت کارآیی پروتئین را افزایش دهند. این محققین همچنین ثابت کردند که کیفیت لاشه نیز در اثر تغذیه با پروبیوتیک‌ها افزایش می‌یابد. همچنین رحمتی و همکاران (۱۳۹۰) ثابت کردند که رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر بیماری‌های باکتریایی بطور معنی‌داری بدنبال تغذیه با پروبیوتیک‌های *Lactobacillus casei*، *L. plantarum* و *L. paracasei* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی افزایش می‌یابد.

با توجه به اهمیت اقتصادی و ارزش تغذیه‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و نیز موارد فوق هدف از بررسی حاضر مقایسه تاثیر تغذیه‌ای ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* به تنهایی و در ترکیب با هم بر رشد و پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش کار

ابتدا ۴۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی (± انحراف معیار) ۵±۶۸ گرم از یک مزرعه پرورش ماهی (ارومیه) تهیه و با استفاده از تانکر مخصوص حمل ماهی مجهز به سیستم اکسیژن به سالن تکثیر و پرورش پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. ماهیان بلافاصله با محلول آب نمک (۳ درصد) ضد عفونی و به مدت ۱۰ روز جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی قرنطینه شدند. پس از گذراندن دوره سازگاری ماهیان بطور کاملاً تصادفی در چهار گروه هر کدام با سه تکرار (هر تکرار ۴۰ عدد ماهی) تقسیم شدند. ماهیان گروه یک فقط با غذای کنسانتره عادی (GFT2) بعنوان شاهد تغذیه شدند. ماهیان گروه‌های دوم تا چهارم بترتیب با غذای کنسانتره حاوی ویتامین C به میزان یک گرم در هر کیلوگرم غذا، غذای کنسانتره حاوی ویتامین C (یک گرم) و *Lactobacillus rhamnosus* (۵×۱۰^{۷} CFU) در هر کیلو و غذای کنسانتره حاوی *Lactobacillus rhamnosus* به میزان ۵×۱۰^{۷} CFU بر گرم به مدت چهار هفته تغذیه شدند. سپس ماهیان دو هفته دیگر فقط با غذای کنسانتر عادی تغذیه شدند. تغذیه ماهیان براساس وزن زنده و دمای آب و طبق جدول استاندارد تغذیه (Hardy, 2002) انجام شد. پرورش در حوضچه‌های بتنی مستطیل شکل و ابعاد ۵/۴×۰/۴۵×۰/۴۵ مترمربع با ورودی آب ۳/۵ لیتر در ثانیه صورت گرفت. همچنین پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌ها به صورت روزانه شامل دما، pH، نیتریت و آمونیاک اندازه‌گیری و ثبت گردید.

ویتامین مورد استفاده در این تحقیق یکی از مشتقات پایدار به نام ال-آسکوربیک-۲-پلی فسفات (L-ascorbic-2-polyphosphate) بوده که بصورت پودر سفید رنگ و با ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده موثره (Calibex®, Unite Kingdom) تهیه گردید.

باکتری مورد استفاده در این بررسی از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم کشور بلژیک (BCCG/LMG 18243) (Belgium Co-ordinated Collections of Microorganism) بصورت ویال لیوفیلیزه تهیه و کشت اولیه آن در شرایط استریل در محیط اختصاصی آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی (در حضور پنج درصد

گاز CO_2) و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. پس از رشد ابتدا تائید باکتری با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی انجام و تا زمان استفاده در حضور ۱۰ درصد گلیسیرین در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت آماده‌سازی غذا ابتدا باکتری نگهداری شده در فریزر در محیط آبگوشت MRS به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و شرایط بی‌هوازی (در حضور ۵ درصد گاز CO_2) و در انکوباتور شیکر دار کشت داده شد. پس از رشد، با دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. در نهایت رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی استریل بصورت سوسپانسیون درآمد و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن تنظیم شد.

به منظور زیست‌سنجی ماهیان، نمونه‌برداری در روز سی‌ام انجام گرفت. ۱۰ عدد ماهی (۳۰ عدد به ازاء هر گروه) بطور کاملاً تصادفی انتخاب و شاخص‌های رشد شامل: وزن نهایی، طول کل، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و وضعیت بدنی محاسبه شد (Tukmechi *et al*., 2011).

در این تحقیق فعالیت لیزوزیم سرم، راه میانبر کمپلمان سرم و میزان آنتی بادی تام پلاسما سنجیده شد. برای این کار تعداد ۳ قطعه ماهی از هر حوضچه (۹ عدد به ازاء هر گروه) بصورت تصادفی انتخاب و نمونه‌های خونی در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری و از ورید ساقه دمی ماهیان پگرفته شد.

میزان فعالیت لیزوزیم سرم براساس روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) و Kim و Austin (۲۰۰۶) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس یعنی (Sigma, USA) *Micrococcus lysodeikticus* و در حضور رقت‌های لیزوزیم سفیده تخم مرغ (Sigma, USA) در مبنای یک دوم به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

فعالین راه میانبر کمپلمان سرم نیز براساس همولیز گلبولهای قرمز خرگوش (RaRBC) و به کمک روش Waley و North (۱۹۹۷)، Boesen و همکاران (۱۹۹۹) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه میزان فعالیت راه میان بر کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی (Log-Log Graph) منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه و از رابطه زیر استفاده می‌شود:

$$ACH50^{1}\ (U/ml) = k \times (\text{فاکتور رقت}) \times ۰/۵$$

در این رابطه k مقداری از سرم است برحسب میلی‌لیتر که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این تست ۰/۰۱ می‌باشد چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۵) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون کروسکال- والیس استفاده گردید. همچنین در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از ثبت پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در جدول ۱ نشان می‌دهد که هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین حوضچه‌ها وجود ندارد. همچنین مقادیر همه پارامترها در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌باشد (Kelly, 1998). همچنین یافته‌های حاصل از زیست سنجی نشان داد شاخص‌هایی مانند وزن نهایی، افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، وضعیت بدنی و کارآیی غذایی ماهیان گروه سه (تغذیه شده با ویتامین C و پروبیوتیک) بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به ماهیان شاهد (گروه یک) و ماهیان تغذیه شده با ویتامین C بیشتر است، اما غیر از وزن نهایی اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین ماهیان گروه سه و ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده نشد. همچنین اندازه‌گیری طول کل نشان داد که هیچگونه اختلاف آماری بین گروه‌ها وجود ندارد (جدول ۲).

1- Alternative pathway total hemolytic complement assay

سنجش فعالیت لیزوزیم سرم نشان داد که میزان آن در ماهیان گروه سه در روزهای ۱۵ و ۳۰ مطالعه بترتیب با ۴۵/۳ و ۵۱/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بیشتر بود. اما در روز ۴۵ یعنی ۱۵ روز پس از قطع تغذیه با ویتامین و پروبیوتیک از میزان فعالیت لیزوزیم سرم گروه‌های دو، سه و چهار کاسته شد و به سطح آن در گروه شاهد رسید (نمودار ۱). همچنین آنالیز فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم نشان داد مشابه لیزوزیم در ماهیان گروه سه در روزهای ۱۵ و ۳۰ بترتیب با ۷۹ و ۹۹ واحد در میلی‌لیتر بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از سایر گروه‌ها بیشتر بود. فعالیت راه میانبر کمپلمان نیز در روز ۴۵ نمونه‌برداری در گروه‌های دو، سه و چهار کاسته شد و به سطح طبیعی آن در گروه شاهد برگشت (نمودار ۲). مقدار آنتی بادی کل پلاسمای ماهیان گروه سه در روز ۱۵ مطالعه بیشتر از سایر گروه‌ها بود ولی اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده نشد. در حالیکه مقدار همین پارامتر در روز ۳۰ مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری با ماهیان گروه شاهد نشان داد (نمودار ۳).

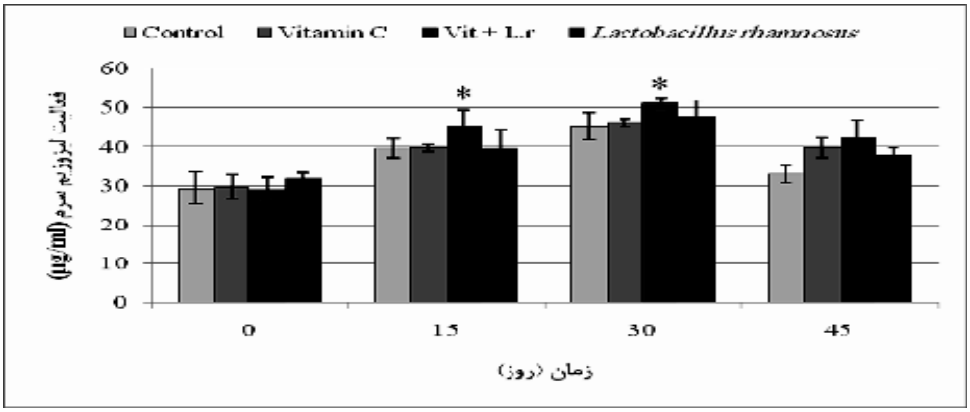
جدول ۱: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی ثبت شده آب حوضچه‌های پرورش ماهی در طول بررسی (میانگین ± انحراف معیار)

دما (سانتیگراد)	اکسیژن (میلی‌گرم بر لیتر)	pH	نیتریت (میلی‌گرم بر لیتر)	آمونیاک (میلی‌گرم بر لیتر)
۱۴/۷±۰/۱۵	۸/۷۵±۰/۵	۷/۸۲±۰/۴۶	۰/۱۲۹±۰/۰۴۵۵	۰/۲۵±۰/۰۵۴

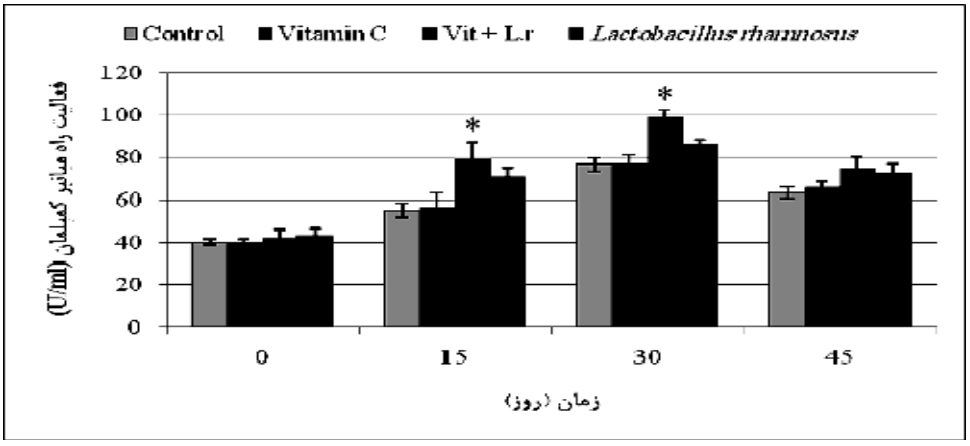
جدول ۲: شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با ویتامین C و *Lactobacillus rhamnosus* (میانگین ± انحراف معیار)

پارامتر	شاهد	ویتامین C	ویتامین با پروبیوتیک	*Lactobacillus rhamnosus*
وزن نهایی (گرم)	۹۰/۶۳±۲/۵۰ a	۹۱/۸۳±۲/۳۵ a	۱۰۲/۰۳±۴/۷۸ c	۹۴/۹۰±۴/۱۲ b
طول کل (سانتیمتر)	۱۹/۶۳±۰/۲۰ a	۱۹/۷۳±۰/۲۵ a	۲۰/۴۶±۰/۳ a	۲۰/۱۳±۰/۴۱ a
افزایش وزن (درصد)	۱۱۵/۶±۴/۲۰ a	۱۳۳/۹±۷/۲ b	۱۷۵/۲±۷/۷ c	۱۶۸/۴±۵/۴ c
ضریب رشد ویژه (درصد)	۱/۱۵±۰/۰۵ a	۱/۱۹±۰/۰۱ a	۱/۴۴±۰/۰۳ b	۱/۴±۰/۰۷ b
وضعیت بدنی	۱/۳±۰/۱۳ a	۱/۳۷±۰/۳۸ a	۱/۴۴±۰/۱۵ a	۱/۴۱±۰/۷۴ a
کارآیی غذایی (درصد)	۷۰/۳±۲/۲۱ a	۷۴/۳±۴/۲۵ a	۹۱/۳±۲/۳۹ b	۸۶/۱۸±۳/۱۳ b

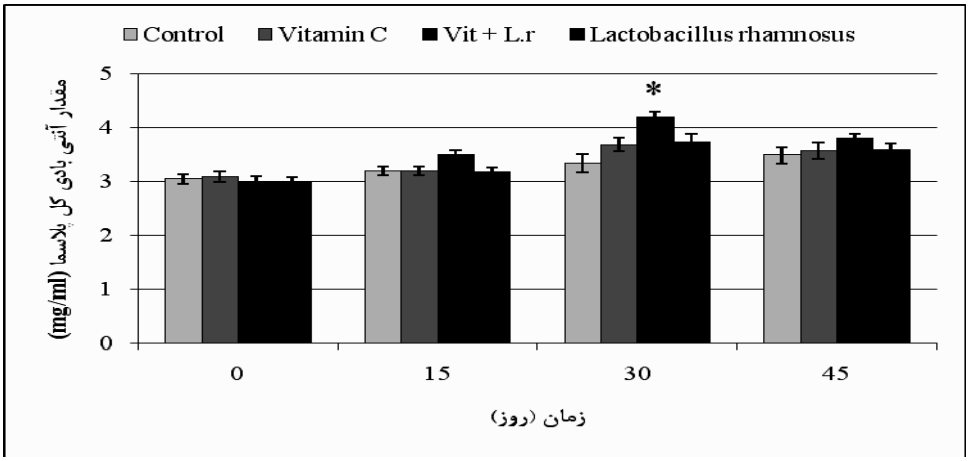
* اعداد دارای حروف یکسان در هر ردیف فاقد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشند.



نمودار ۱: میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان تغذیه شده با ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* مقادیر بصورت Mean ±SD آورده شده و سطح معنی‌دار آزمون آماری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲: میزان فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم ماهیان تغذیه شده با ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* مقادیر بصورت Mean ±SD آورده شده و سطح معنی‌دار آزمون آماری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۳: میزان آنتی بادی کل پلاسما ماهیان تغذیه شده با ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* مقادیر بصورت Mean ±SD آورده شده و سطح معنی‌دار آزمون آماری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

بحث

افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث ایجاد تعادل میکروبی روده، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی از آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارآیی سیستم ایمنی، افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و به دنبال آن افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی می‌شود (Gatesoupe, 1999; Kim & Austin, 2006). Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند *Lactobacillus rhamnosus* دارای خواص پروبیوتیکی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است و باعث بهبود رشد و ایجاد تعادل باکتریایی روده می‌شود. همچنین در بررسی دیگری Panigrahi و همکاران (۲۰۰۴) ثابت کردند این باکتری با افزایش فعالیت لیزوزیم، راه میانبر کمپلمان سرم و بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید کلیه قدامی سبب تحریک ایمنی ذاتی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود.

Gatesupe و همکاران (۱۹۹۹) بیان نمودند که برخی از پروبیوتیک‌ها موجب افزایش اشتهای میزبان می‌شوند و در نتیجه آن شاخص‌های رشد از جمله وزن نهایی بهبود پیدا می‌کنند، نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد که *L. rhamnosus* بطور معنی‌داری وزن نهایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را نسبت به ماهیان شاهد افزایش داد. Irianto و Austin در سال ۲۰۰۲ عنوان کردند که اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به غذای ماهی باعث افزایش فعالیت‌های گوارشی، آنزیمی و تحریک اشتها و نهایتاً افزایش رشد می‌شوند. Merrifield (۲۰۰۹) اعلام کرد که اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای رشد از جمله ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به ماهیان شاهد وجود دارد.

ویتامین C نیز یکی از ترکیبات طبیعی ضد استرس در ماهیان محسوب شده که دارای وظایف بیشماری است (Zhou *et al.*, 2002)، از جمله می‌توان به تحریک سیستم ایمنی از جمله تحریک فعالیت راه میانبر کمپلمان و لیزوزیم سرم، تشدید بیگانه خواری گلبول‌های سفید و تکثیر لنفوسیت‌ها اشاره نمود (Verlhec *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 1999). همچنین این ویتامین در ماهیان سبب بهبود رشد می‌شود (Dabrowski, 2001). یافته‌های بدست آمده از این بررسی نشان داد که ویتامین C قادر است شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را افزایش دهد اما در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. Nayak و همکاران (۲۰۰۷) ثابت کردند که استفاده همزمان پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و ویتامین C در ماهی روهو (*Labeo rohita*) می‌تواند بطور معنی‌داری شاخص‌های رشد را افزایش دهد. این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد چون استفاده توام این ویتامین و *Lactobacillus rhamnosus* قادر است رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را نیز افزایش دهد.

تحریک ایمنی ذاتی ماهیان بدنبال تغذیه با پروبیوتیک‌ها توسط مطالعات جداگانه‌ای به اثبات رسیده است (Gatesoupe, 1999; Kim & Austin, 2006; Merrifield *et al.*, 2009)، اما Verlhac و همکاران (۱۹۹۸)، Montero و همکاران (۱۹۹۹)، Ai و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقات جداگانه‌ای به این نتیجه رسیدند که وجود ویتامین C در سطح مناسبی در جیره غذایی آبزیان دارای تاثیر مثبتی بر فاکتورهای ایمنی از جمله تحریک فعالیت راه میانبر کمپلمان و لیزوزیم سرم، مقدار آنتی بادی کل پلاسما، تشدید عمل بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید، تکثیر لنفوسیت‌ها و غیره می‌شود. محققان دیگری از جمله Jorgensen و همکاران (۱۹۹۳) و Engstad و همکاران (۱۹۹۲) بیان نمودند که استفاده از محرک های ایمنی از جمله ویتامین C در جیره غذایی ماهیان باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم می‌شود. در مطالعه حاضر همانطور که انتظار می‌رفت ویتامین C و *Lactobacillus rhamnosus* توانستند میزان فعالیت لیزوزیم و راه میانبر کمپلمان را افزایش دهند که این افزایش در تیمار سه (ترکیب ویتامین و پروبیوتیک) و در روزهای ۱۵ و ۳۰ مطالعه نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌دار بیشتر بود ($P<۰/۰۵$) .

براساس یافته‌های بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و ویتامین C بصورت ترکیبی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های رشد و پاسخ‌های ایمنی این ماهی گردد. لازم به ذکر است که جهت کسب نتایج مطمئن انجام بررسی‌های میدانی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات انجام گرفته و نویسندگان این مقاله از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی و نیز دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مالی تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منابع

جعفریان، ح.ا.؛ سلطانی، م.؛ طاعتی، م.؛ نظرپور، ع.ر. و مروت، ر.ا.، ۱۳۹۰. مقایسه تاثیر باسیلوس‌های مستخرج از روده لارو ماهیان خاویاری *Acipenser persicus* و *Huso huso* با پروبیوتیک‌های تجاری بر رشد و بقاء لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۱، صفحات: ۳۹ تا ۴۶.

رحمتی اندانی، ح.ر.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰. افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در برابر عفونت با آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری با استفاده از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران، دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات: ۲۶ تا ۳۵.

ناصری، س.؛ نظامی بلوچی، ش.؛ خارا، ح.؛ فرزانفر، ع.؛ لشتو آقایی، غ. و شکوری، م.، ۱۳۸۷. بررسی عملکر رشدلارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استفاده از سطوح متفاوت پروبیوتیک و آهن مکمل شده در جیره غذایی. مجله علمی شیلات، سال دوم، شماره سوم، پائیز ۱۳۸۷، صفحات: ۱ تا ۷.

Ai Q., Mai K. and Zhang C., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, Lateolabrax japonicus. Aquaculture, 242:489-500.

Amar E.C., Kiron V., Satoh S., Okamoto N. and Watanabe T., 2000. Effects of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 66:1068-1075.

Boesen H.T., Pedersen K., Larsen J.L., Koch C. and Ellis A.E., 1999. *Vibrio anguillarum* resistance Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Serum: Role of O-Antigen structure of Lipopoly-saccharide. Infection and Immunity, 67(1):294-301.

Clerton P., Troutaud D., Verlhac V., Gabraudan, J. and Deschaux P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11:1-13.

Dabrowski K., 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms Status and Perspectives. CRC Press, USA. pp.33-48.

Engstad R.E., Robertsen B. and Frivold E., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated hemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunology, 2:287-297.

Gatesoupe F.J., 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180:147-165.

Hardy R.W., 2002. Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *In*: (C.D. Webster and C.E. Lim Eds.), Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing, Wallingford, Oxford, United Kingdom, 1:184-202.

Irianto A. and Austin B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease, 25:333-342.

Jorgensen J.B., Lunde H. and Robertsen B., 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease, 16:313–325.

Kelly L.A., 1998. Water quality and rainbow trout farming. Fish Veterinary Journal, 21:31-45.

Kim D.H. and Austin B., 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by probiotics. Veterinary Immunology and Immunopathology, 114:297-304.

Liu K., Chiu C., Shiu Y., Cheng W. and Liu C., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish and Shellfish Immunology, 28:837-844.

Merrififld D., Bardley G., Baker R. and Davies S., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post-antibiotic treatment. Aquaculture Nutrition, 22:141-150.

Montero D., Marrero M., Izquierdo S., Robina L., Vergara J.M. and Tort L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead Seabream (*Sparu saurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 171:269-278.

Nayak S.K., Swain P. and Mukherjee S.C., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology, 23:892-896.

Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S. and Lilius E.M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15:443-452.

Nikoskelainen S., Salminen S., Bylund G. and Ouwehand A.C., 2001. Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious disease in fish. Applied and Environmental Microbiology, 67(6):2430-2435.

Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S. and Sugita H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immuno-pathology, 102:379-388.

Siwicki A.K., Anderson D.P. and Rumsey G.L., 1994. Dietary intake of immunostImulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41:125-139.

Tukmechi A., Rahmati Andani H.R., Manaffar R. and Sheikhzadeh N., 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish and Shellfish Immunology, 30:923-928.

Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schuep W. and Hole R., 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout

1: Oxford University Press, Oxford, Great Britain, pp.19-47.

Zhou X., Niu C., Sun R. and Li Q., 2002. The effect of vitamin C on the non-specific immune response of the juvenile soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*). Comparative Biochemistry and Physiology, 131:917-922.

(*Oncorhynchusmykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 8:409-424.

Waley K. and North J., 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. *In*: (A.W. Dodds and R.B. Sim eds.), Complement: A Practical Approach, Vol.

Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Tookmehchi A.[*(1)]; Shamsi H.[(2)]; Meshkini S.[(3)]; Delshad R.[(4)] and Ghasemi Moghanjoei A.[(5)]

atokmachi@gmail.com

1-Pathobiology and Quality Control Group, Artemia & Aquatic Animals Research Institute, Uremia University, P.O.Box: 57153-1656 Uremia, Iran

2- Faculty of Natural Resources, Uremia University, P.O.Box: 57153-1656 Uremia, Iran

3- Marine Health & Disease Group, Veterinary Faculty, Uremia University, P.O.Box: 57153-1656 Uremia, Iran

4-Microbiology Group, Islamic Azad University, Uremia Branch, P.O.Box: 969 Uremia, Iran

5- Marine Health & Disease Group, Veterinary Faculty, P.O.Box: 57153-1656 Uremia, Iran

Received: May 2012 Accepted: September 2012

Keywords: Nutrition, Blood component, Food compliment, Biological characters

Abstract

The effects of dietary vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* on immunity and growth performance were investigated in *Oncorhynchus mykiss*. For this purpose, 480 rainbow trout (68±5g) were obtained from a local farm and acclimated to laboratory conditions for 10 days and then divided into four groups in three replicates. During 30 days, juvenile rainbow trout were fed diets supplemented with vitamin C (1g/kg) and *L. rhamnosus* (at 5×10^7 CFU/g) or a control diet. Biometry was done at day -30 and blood samples were taken by caudal vein after fish anesthesia with clove powder at day 0, 15, 30 and 45. Serum lysozyme activity, alternative complement activity and total plasma immunoglobulin level were assayed as innate immune response of rainbow trout. Results showed fish fed with vitamin c and *L. rhamnosus* (group 3) statistically could improve fish growth performance. Also lysozyme activity and alternative complement activity of serum significantly were higher in group three than other groups, but total plasma level of immunoglobulin only was higher than all groups at day 30. In conclusion dietary administration of vitamin C and *L. rhamnosus* in rainbow trout diet could enhance the growth and innate immune response, but these properties need further studies on the field applications.

*Corresponding author