تاثیر پروبیوتیک باکتوسل و پربیوتیک مانان اولیگوساکارید بر مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر تنش هیپوکسی و افزایش دما

- **رضوانه جنابی‌حق‌پرست***: گروه شیلات، دانشکده منابع‌طبیعی، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ۱۶۵-۵۷۱۵۳
- **سعید مشکینی**: گروه‌بهداشت و کنترل‌کیفی‌موادغذایی، دانشکده‌دامپزشکی، دانشگاه‌ارومیه، صندوق‌پستی:۱۶۵-۵۷۱۵۳
- **امیر توکمه‌چی**: گروه‌پاتوبیولوژی و کنترل‌کیفی، پژوهشکده‌آرتمیا و آبزیان، دانشگاه‌ارومیه، صندوق‌پستی:۱۶۵-۵۷۱۵۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۲

چکیده

در این مطالعه مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک تجاری (باکتوسل) و پربیوتیک مانان اولیگوساکارید در برابر تنش هیپوکسی و افزایش دما مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۷۲۰ قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن اولیه (۲±۱۰ گرم) در شش گروه تغذیه‌ای (با سه تکرار) مورد آزمایش قرار گرفتند: ۱) تغذیه با غذای تجاری (شاهد)، ۲) تغذیه با باکتوسل (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)، ۳) تغذیه با مانان اولیگوساکارید (۲/۵ گرم در کیلوگرم غذا)، ٤) تغذیه با مانان اولیگوساکارید (۵ گرم در کیلوگرم غذا)، ۵) تغذیه با ۱۰۰ میلی‌گرم باکتوسل و ۲/۵ گرم مانان اولیگوساکارید در کیلوگرم غذا) و ٦) تغذیه با ۱۰۰ میلی‌گرم باکتوسل و ۵ گرم مانان اولیگوساکارید در کیلوگرم غذا. پس از ٤۵ روز نتایج تحقیق نشان داد، روده ماهیانی که به‌طور هم‌زمان با پروبیوتیک و پربیوتیک تغذیه شده بودند حاوی بیش‌ترین میزان پروبیوتیک بوده که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود. حداقل تلفات آزمایش تنش افزایش دما در گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک و پربیوتیک دیده شد (P< ۰/۰۵) و بیش‌ترین مقاومت ماهیان در برابر استرس هیپوکسی، در تیمارهای ٤ و ٦ دیده شد که به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک باکتوسل، پربیوتیک مانان اولیگوساکارید.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rezvanehjenabi@yahoo.com

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های تجاری آزاد ماهیان در ایران است. از نکات مهم در پرورش این ماهی اعمال مدیریت صحیح تغذیه و بالا بردن مقاومت آن در برابر استرس‌های محیطی است. به‌منظور افزایش تولید و حداکثر استفاده از امکانات موجود، اکثر کشورها به پرورش متراکم آبزیان رو آورده‌اند، در این شرایط ایجاد استرس و متعاقب آن بروز بیماری‌های عفونی و مشکلات مدیریتی دور از انتظار نیست. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اولین گزینه پرورش‌دهندگان به‌دنبال شیوع بیماری باکتریایی است. استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر ایجاد سویه‌های مقاوم در باکتری‌های بیماری‌زا مشکلات عدیده دیگری نیز به‌همراه دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به مسائل مربوط به بهداشت عمومی، آلودگی‌های زیست‌محیطی و غیره اشاره کرد (Fuller، ۱۹۸۹).

تحقیقات نشان داده است که می‌توان با استفاده از مکمل‌های غذایی سودمند همانند پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها، مقاومت ماهیان را در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌های محیطی افزایش داد (Amar و همکاران، ۲۰۰۰؛ David و همکاران، ۱۹۹۹). جستجو برای یافتن جایگزین مناسب به‌جای آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد ضروری به‌نظر می‌رسد، مکمل‌های غذایی همانند پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها به‌عنوان فرآورده‌های طبیعی و ایمن گزینه خوبی برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها و هم‌چنین افزایش رشد آبزیان می‌باشند. طبق نظر Browdy (۱۹۹۸) استفاده از پروبیوتیک‌ها یکی از روش‌های مهم در کنترل بیماری‌هاست. پروبیوتیک‌ها با ایجاد تغییرات مفید در جمعیت میکروبی روده آبزیان از طریق تحریک رشد باکتری‌های مفید و کاهش جمعیت میکروب‌های بیماری‌زا در نتیجه رقابت آن‌ها با عوامل بیماری‌زا برای مواد مغذی و جایگاه اتصال به مخاط روده و هم‌چنین بوسیله تحریک رشد میکروب‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک و در نتیجه تغییر در pH روده، تولید ویتامین‌ها و مواد مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها ویژگی‌های درمانی خود را به‌اثبات رسانده‌اند هم‌چنین استفاده مناسب از آن در تغذیه سبب هضم بهتر در دستگاه گوارش می‌شود و کیفیت آب را بهبود می‌بخشد و یا سیستم ایمنی میزبان را تقویت می‌کند (کریم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

براساس تعریف Fuller پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی هستند که به‌طور مؤثر و سودمندی بر میزبان تأثیر می‌گذارند و تعادل فلور میکروبی روده را بهبود می‌بخشند (Fuller، ۱۹۸۹).

بسیاری از محققان واکنش‌های میکروارگانیسم‌های روده‌ای را با محیط آبزیان و خوراک‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند. براساس تحقیقات Cahill به‌نظر می‌رسد گونه‌های میکروبی موجود در روده از همان گونه‌هایی باشند که در محیط و یا جیره وجود دارند که توانسته‌اند در روده زنده مانده و تکثیر شوند (Cahill، ۱۹۹۰). تحقیقات صورت گرفته نشان داده است که پروبیوتیک‌ها باعث افزایش عملکرد هضمی آنزیم‌ها (Torrecillas و همکاران، ۲۰۰۷)، افزایش معیارهای رشد و تغذیه‌ای (Gomez-Gill و همکاران، ۱۹۹۸) و افزایش ایمنی و بقاء لاروهای ماهی (David، ۱۹۹۹) می شوند. Merrifield و همکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند که استفاده از پروبیوتیک در جیره ماهی قزل‌آلا در افزایش ضریب کارایی غذایی و کاهش ضریب تبدیل غذایی، تعادل میکروبی روده و سلامتی و بازماندگی آن‌ها موثر است. هم‌چنین مشاهده شده است که برخی از پروبیوتیک‌ها مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک باعث افزایش اشتها، تقویت ایمنی و بهبود رشد آبزیان می‌گردند که این پدیده احتمالاً به‌دلیل افزایش قابلیت هضم مواد غذایی می‌باشد (Ringo و Gatesoupe، ۱۹۹۸).

باکتوسل (Bactocell) نوعی پروبیوتیک تجاری مجاز در آبزیان می‌باشد که سال ۲۰۰۹ در اتحادیه اروپا به ثبت رسیده است. این پروبیوتیک تجاری، حاوی تعداد 1×10^{10} CFU/g باکتری *Pediococcus acidilactici* می‌باشد. این باکتری با افزایش باکتری‌های مفید روده، تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH روده، موجب توقف رشد پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش شده و با تحریک سیستم ایمنی آبزیان مقاومت آن‌ها را علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل استرس‌زا به‌میزان معنی‌داری افزایش می‌دهد. طبق توصیه شرکت سازنده باکتوسل (لالمند، فرانسه)، مقدار مصرف آن ۱۰۰ گرم درهر تن خوراک و در تمام طول دوره پرورش می‌باشد (کریم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱).

طبق گزارش‌های Gatesoupe (۱۹۹۹)، Verschuere و همکاران (۲۰۰۰) و Irianto و Austin (۲۰۰۲) پروبیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت لارو آبزیان در برابر استرس‌های محیطی می‌شوند. طبق یافته‌های این محققین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تحریک سیستم ایمنی میزبان باعث تحمل بهتر محرک‌ها و استرس‌های محیطی شوند. Castex و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* باعث تقویت ایمنی، کاهش عفونت در برابر رویایی با پاتوژن و کاهش تلفات در میگو *Litopenaeus stylirostris* می‌شود.

پربیوتیک ماده غذایی غیرقابل هضمی است که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی برای میزبان داشته و می‌تواند سلامتی میزبان را بهبود بخشد. براساس این تعریف هر ماده غذایی که به روده می‌رسد مانند کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم، بعضی از پپتیدها، پروتئین‌ها و نیز برخی از چربی‌ها می‌توانند به‌عنوان پربیوتیک مطرح باشند (Gibson و Roberfroid، ۱۹۹۵).

Staykov و همکاران (۲۰۰۷) به کارآیی و پتانسیل پربیوتیک مانان الیگوساکارید به میزان ۲ گرم در کیلوگرم یا ۲۰۰ قسمت در میلیون در بهبود عملکرد رشد، بازماندگی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در ماهی قزل‌آلای پرورشی اشاره کردند. طبق گزارش Salze و همکاران (۲۰۰۸) استفاده از مانان اولیگو ساکارید خوراکی باعث افزایش مقاومت لارو ماهی کوبیا (*Rachycentron canadum*) در برابر استرس شوری می‌شود. افزودن مانان اولیگو ساکارید به غذا در حفظ آلوستاسیس (Allostasis) به لارو کوبیا کمک می‌کند و درنتیجه سازش‌پذیری آن را در برابر تغییرات محیطی افزایش می‌دهد. Sang و همکاران (۲۰۰۹) نیز به این نتیجه رسیدند که مکمل غذایی مانان اولیگو ساکارید باعث افزایش معنی‌دار ایمنی و سلامتی عمومی *Cherax tenuimanus* در برابر آلودگی باکتریایی و افزایش میزان آمونیاک و استرس جابجایی می‌شود. Torrecillas و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که افزودن مانان اولیگوساکارید به غذای *Dicentrarchus labrax* باعث کاهش اثر عوامل استرس‌زا و افزایش مقاومت در برابر رویایی باکتریایی با *Vibrio anguillarum* از طریق تقویت سیستم ایمنی آن می‌شود. تاثیر مثبت و معنی‌دار مانان اولیگوساکارید خوراکی بر افزایش رشد و مقاومت میگوی *Litopenaeus vannamei* در برابر استرس آمونیاک توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۲) نیز تایید شده است. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر تاثیر پروبیوتیک باکتوسل و پربیوتیک مانان اولیگوساکارید به تنهایی و در ترکیب بر تراکم باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و مقاومت آن در برابر استرس‌های دما و اکسیژن صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و طراحی آزمایش: این تحقیق در اسفند ۱۳۸۹، در سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه به‌مدت ۶۰ روز و طی مراحل زیر انجام گرفت. تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۲±۱۰ گرم از یکی از مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا تهیه شد. جهت انتقال ماهی‌ها به آزمایشگاه از تانکر مخصوص حمل ماهی (مجهز به کپسول اکسیژن) استفاده گردید. ماهیان منتقل شده در مخازن ۱۰۰۰ لیتری (که قبلاً با فرمالین ضد عفونی شده بودند) رهاسازی شده و بلافاصله با محلول نمک ۳ درصد ضدعفونی شدند (رحمتی و همکاران، ۱۳۸۹). هم‌چنین ماهی‌ها به‌لحاظ وجود انگل‌های خارجی و وجود بیماری‌های احتمالی، مورد ارزیابی قرار گرفته و به‌مدت ۷ روز با شرایط آزمایشگاهی سازش یافتند. پس از طی دوره سازش، ماهیان به شش گروه تغذیه‌ای (در سه تکرار) تقسیم شدند: گروه اول به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و در طول مطالعه با غذای تجاری تغذیه گردید. گروه دوم تغذیه با پروبیوتیک باکتوسل (۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)، گروه سوم تغذیه با پربیوتیک مانان اولیگوساکارید (۲/۵ گرم در کیلوگرم غذا)، گروه چهارم تغذیه با پربیوتیک مانان اولیگوساکارید (۵ گرم در کیلوگرم غذا)، گروه پنجم تغذیه با ۱۰۰ میلی‌گرم باکتوسل و ۲/۵ گرم مانان اولیگوساکارید در کیلوگرم غذا) و گروه ششم تغذیه با ۱۰۰ میلی‌گرم باکتوسل و ۵ گرم مانان اولیگوساکارید در کیلوگرم غذا تغذیه شدند. هر تکرار شامل ۴۰ قطعه ماهی بود و نحوه چیدن حوضچه‌ها به‌صورت بلوک‌های کاملاً تصادفی انتخاب شد. تغذیه ماهیان براساس وزن توده زنده و درجه حرارت آب، چهار وعده در روز به‌مدت ۴۵ روز صورت گرفت. آب مورد استفاده در این تحقیق از یک حلقه چاه تامین گردید. در تمام دوره تحقیق، آب استخرهای پرورشی جاری بوده و میانگین دما، شوری، pH و اکسیژن محلول استخرها به‌ترتیب ۱۴/۱ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵ گرم در لیتر، ۷/۶ و ۱۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بود.

تهیه غذا: در این مطالعه پروبیوتیک تجاری باکتوسل (Bactocell) حاوی باکتری *Pediococcus acidilactici* به میزان 1×10^{10} CFU/g از شرکت Lallemand فرانسه، تهیه شد. هم‌چنین پربیوتیک مانان الیگوساکارید از شرکت تک‌فرآوری آریا خریداری گردید. برای افزودن آن‌ها به‌غذای تجاری FFT-۱[۱] و FFT-۲ (جدول ۱) محصول شرکت فرآدانه، ابتدا غذای مورد نیاز هر تیمار به‌صورت جداگانه محاسبه و سپس مقادیر انتخاب شده از پروبیوتیک (۱۰۰ میلی‌گرم) و پربیوتیک (۲/۵ و ۵ گرم)

۱ -Fingerling food For Trout

در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون نموده و به‌همراه ۵ میلی‌لیتر روغن مایع آفتابگردان بر روی غذا اسپری شد. سپس اجازه داده شد غذا به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در محل تمیز خشک گردد. در غذای ماهیان گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی و روغن مایع اسپری گردید، در ضمن تهیه غذا به‌صورت روزانه انجام شد (رحمتی و همکاران، ۱۳۸۹).

جدول ۱: آنالیز تقریبی غذای تجاری مورد استفاده

ماده	FFT-۱	FFT-۲
پروتئین خام (حداقل)	٪۴۳	٪۴۲
چربی خام (حداقل)	٪۱۲	٪۱۲
خاکستر (حداکثر)	٪۱۳	٪۱۳
فیبر (حداکثر)	٪۳/۷	٪۳/۷
فسفر (حداقل)	٪۰/۸۵	٪۰/۸۵
رطوبت (حداکثر)	٪۱۰	٪۱۰

بررسی باکتری شناسی روده ماهیان: در این مطالعه در دوره سازش به‌صورت تصادفی تعداد ۶ قطعه ماهی و در طی تغذیه با پروبیوتیک و پربیوتیک هر ۱۵ روز یک‌بار و از هر تکرار ۲ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی به‌منظور شمارش و بررسی فلور باکتریایی غالب روده ماهیان انتخاب گردیدند. برای این کار ابتدا ماهیان با زدن ضربه به سر کشته شده و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. سپس در شرایط استریل پس از ضدعفونی سطح بدن با بتادین و الکل ۷۰ درجه، خط میانی شکم با اسکالپل استریل شکافته شده و در شرایط استریل محتویات روده‌ها از ابتدا تا ۱ سانتی‌متری مخرج جمع‌آوری و توزین گردید. سپس از محتویات روده رقت سریال (10^{-1}-10^{-8}) با سرم فیزیولوژی استریل تهیه و کشت بر روی محیط MRS و BHI آگار در دو حالت هوازی و بی‌هوازی صورت گرفت. تعداد کلنی‌های باکتری *Pediococus asidilactici* روی محیط‌های کشت پس از ۲۴ ساعت شمارش شده و نتیجه برحسب CFU در هر گرم محتویات از روده گزارش گردید (Merrifield و همکاران، ۲۰۰۹).

بررسی میزان مقاومت ماهی در برابر تنش افزایش دما: به‌طورکلی تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار در ۲ تکرار، به‌صورت تصادفی انتخاب و در داخل تانک‌های ۴۵ لیتری جداگانه‌ای که قبلاً دمای آب آن‌ها به‌وسیله بخاری‌های برقی درحد ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردیده بود، قرار داده شدند و فعالیت‌های شنای ماهیان و تلفات آن‌ها تا ۲۴ ساعت مشاهده و ثبت گردید.

بررسی میزان مقاومت ماهی در برابر تنش هیپوکسی: برای بررسی اثرات استرس فقدان اکسیژن نیز تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار در ۲ تکرار، به‌طور تصادفی توسط ساچوک صید و به‌مدت‌های ۳ و ۶ دقیقه خارج از آب در شرایط فاقد اکسیژن محلول نگه‌داشته شدند و سپس مجدداً به داخل تانک‌های پرورشی با آب جاری منتقل گردیدند. رفتار شنای ماهیان و تلفات ماهیان تا ۱۲ ساعت مشاهده و ثبت شد، تا تلفات ماهی‌ها و در نتیجه میزان مقاومت آن‌ها در هر گروه تیماری نسبت به استرس کمبود اکسیژن مورد بررسی قرار گیرد (آذری‌تاکامی و همکاران، ۱۳۸۴).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی (Tukey's Test) آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود، استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج بررسی باکتری‌شناسی روده: در روز صفر روده ماهی‌ها فاقد *Pediococus acidilactici* بود و با شروع مصرف پروبیوتیک و پربیوتیک، در تیمارهای ۲ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا)، ۵ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک مانان الیگوساکارید ۲/۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۶ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک مانان الیگوساکارید ۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) به‌تدریج تعداد باکتری در روده افزایش یافت و در روز ۴۵ به حداکثر تراکم رسید. بیش‌ترین تعداد باکتری در روده ماهیان تیمار ۶ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی گرم و پربیوتیک ۵ گرم به‌ازاء هرکیلوگرم غذا) دیده شد که به‌طور معنی‌داری از میزان آن در سایر تیمارها بیش‌تر بود ($P<۰/۰۵$) ، تیمارهای ۵ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک ۲/۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۲ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازاء هرکیلوگرم غذا) از نظر غلظت میزان این باکتری در جایگاه‌های بعدی قرار داشتند. ولی از روز ۴۵ به بعد با قطع پروبیوتیک و پربیوتیک از تعداد باکتری‌ها کاسته شد (جدول ۲).

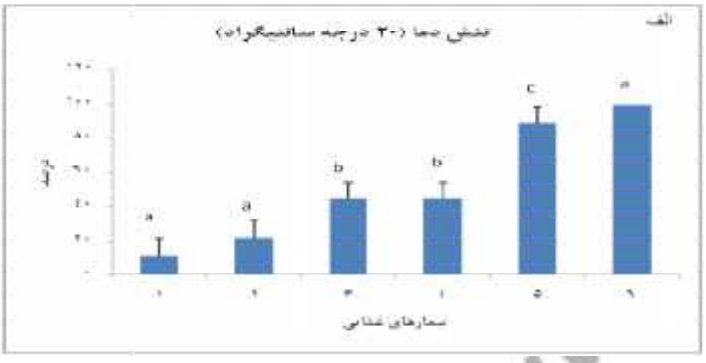
جدول ۲: نتایج شمارش باکتری *Pediococus asidilactici* در محتویات روده ماهیان تحت آزمایش(CFU/gr)

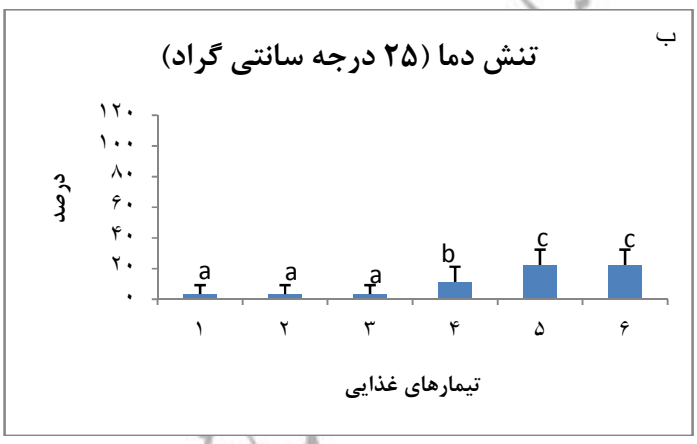
تیمار	روزهای نمونه‌برداری				
	روز صفر	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
تیمار یک (شاهد)	۰	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}
تیمار دو	۰	۹۲۰ ^{b}	۱/۱ × ۱۰^{۶} ^{b}	۰/۸ × ۱۰^{۷} ^{b}	۰/۲ × ۱۰^{۴} ^{b}
تیمار سه	۰	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}
تیمار چهار	۰	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}
تیمار پنج	۰	۹۵۰ ^{b}	۳/۶ × ۱۰^{۶} ^{c}	۵/۹ × ۱۰^{۷} ^{c}	۰/۹ × ۱۰^{۵} ^{c}
تیمار شش	۰	۹۵۰ ^{b}	۵/۲ × ۱۰^{۷} ^{d}	۶/۷ × ۱۰^{۸} ^{d}	۲/۶ × ۱۰^{۵} ^{d}

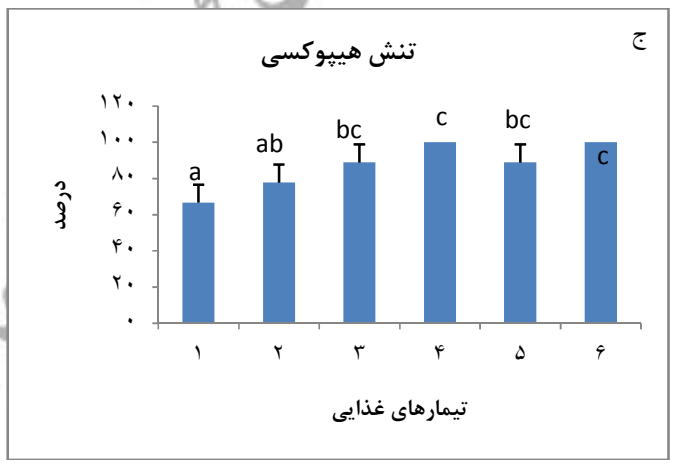
حروف متفاوت در هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵)

تنش دما و اکسیژن: حداقل بازماندگی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تیمارهای ۱ (شاهد) و ۲ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم به ازاء هرکیلوگرم غذا) دیده شد که به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها کم‌تر بود. بیش‌ترین بازماندگی در تیمارهای ۵ و ۶ دیده شد، تیمارهایی که به‌طور هم‌زمان از پروبیوتیک و پربیوتیک تغذیه کرده بودند. بازماندگی در این تیمارها به‌طور معنی‌داری از کلیه تیمارها بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). درصد بازماندگی در گروه‌های ۳ (پربیوتیک ۲/۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۴ پربیوتیک ۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) که فقط مانان اولیگوساکارید به‌همراه غذا دریافت کرده بودند به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمارهای ۱ و ۲ و کم‌تر از تیمارهای ۵ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک ۲/۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۶ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک ۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) بود (P<۰/۰۵). قرار گرفتن ناگهانی ماهیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باعث تلفات سنگین در اکثر تیمارها شد. با این‌که ماهیان تیمارهای ۵ و ۶ مقاومت بالایی از خود نشان دادند ولی میزان بازماندگی در این تیمارها نیز فقط ۲۲/۳ درصد بود (شکل ۱).

ماهیان مورد آزمایش در کلیه تیمارها در برابر کمبود اکسیژن به‌مدت ۳ دقیقه مقاوم بودند و پس از این‌که به‌داخل تانک با آب جاری برگردانده شدند، تلفاتی مشاهده نشد. ولی نگه‌داشتن آن‌ها به‌مدت ۶ دقیقه بیرون از آب باعث شد تعدادی از ماهی‌ها به‌تدریج تلف شوند. حداقل بازماندگی (۶۶/۷ ٪) در تیمار شاهد مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از تیمارهای ۳ (پربیوتیک ۲/۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) الی ۶ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک ۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) کم‌تر بود. در تیمارهای ۴ (پربیوتیک ۵ گرم به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۶ (پروبیوتیک ۱۰۰ میلی‌گرم و پربیوتیک ۵ گرم به ازاء هر کیلوگرم غذا) در طی ۱۲ ساعت تلفاتی مشاهده نشد (شکل ۱).







شکل ۱: نمودار درصد بازماندگی تحت تنش‌های دما (الف و ب) و تنش اکسیژن (ج)

حروف متفاوت در هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵)

بحث

امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها را می‌توان در تمام زمینه‌های تولید کشاورزی، آبزی‌پروری و محیط‌زیست مشاهده نمود. استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌دو دلیل صورت می‌گیرد: الف) بهبود شرایط زیست‌محیطی آبزیان و ب) معرفی میکروفلور مفید به لوله گوارش آن‌ها (کریم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). به‌کارگیری موثر پربیوتیک‌ها در آبزیان نیازمند شناخت

جمعیت و نوع میکروب‌های لوله گوارشی آبزیان می‌باشد. باکتری‌های ساکن روده قادرند به‌طور انتخابی پربیوتیک‌ها را تخمیر کنند، تخمیر قندهای موجود در روده سبب افزایش انرژی و رشد این باکتری‌ها می‌شود و بدین وسیله باعث تقویت میکرو فلور روده‌ای و ممانعت از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا می گردد (پورامینی و حسینی‌فر، ۱۳۸۶).

هدف از انجام مطالعه حاضر افزودن هم‌زمان پروبیوتیک باکتوسل و پربیوتیک مانان الیگوساکارید خوراکی به جیره غذایی ماهی قزل‌آلا جهت افزایش مقاومت و بازماندگی این گونه اقتصادی در برابر استرس‌های محیطی بود، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن توام مانان اولیگوساکارید و پروبیوتیک باکتوسل به غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌دار ($P<0/05$) تعداد باکتری در روده ماهیان می‌شود. اثر پربیوتیکی مانان اولیگوساکارید و تاثیر مثبت آن بر بهبود تنوع و غنای باکتریایی روده ماهی (*Sparus aurata*) توسط Dimitroglou و همکاران (۲۰۱۰) به‌اثبات رسید. افزایش تعداد باکتری در روده با میزان پربیوتیک افزوده شده به غذا در ارتباط بود که در نهایت باعث بیش‌ترین مقاومت در برابر افزایش دما و شرایط بی‌اکسیژنی (هیپوکسی) گردید. نتایج تحقیق هم‌چنین تایید نمود که استفاده توام سطوح مختلف پروبیوتیک باکتوسل و پربیوتیک مانان اولیگوساکارید می‌تواند مقاومت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را در برابر تنش دمایی به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بالا ببرد، افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک باکتوسل و ۵ گرم پربیوتیک مانان الیگوساکارید مانع از ایجاد تلفات در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد شد در حالی‌که حدود ۹۰٪ ماهیان گروه شاهد تلف شدند. ولی به‌نظر می‌رسد تحمل دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد حتی در شرایط تغذیه توام با پروبیوتیک و پربیوتیک بسیار سخت است چون فقط تعداد کمی توانستند این دمای بالا را تحمل کنند و زنده بمانند درحالی‌که ماهیان تیمار شاهد و هم‌چنین تیمارهایی که از پروبیوتیک و پربیوتیک (۲/۵ گرم در هر کیلوگرم غذا) به‌صورت جداگانه تغذیه کرده بودند ۱۰۰٪ تلف شدند. از طرف دیگر استفاده از ۵ گرم مانان اولیگوساکارید به‌ازاء هر کیلوگرم غذا به‌صورت جداگانه و یا به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک باکتوسل به‌ازاء هر کیلوگرم غذا) به‌طور کامل از وقوع تلفات در تنش کمبود اکسیژن پیشگیری نمود، در حالی‌که ۳۳ درصد ماهیان تیمار شاهد تلف شدند.

اکرمی و همکاران (۱۳۸۷) با اضافه کردن پربیوتیک اینولین به‌میزان ۱ تا ۳ درصد جیره در فیل‌ماهیان جوان پرورشی دریافتند، ماهیان تغذیه شده با کم‌ترین سطح اینولین به‌میزان یک درصد، تعداد کل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* روده به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها بالاتر بود و این محققین گونه *Lactobacillus plantarum* را تحت شرایط هوازی از روده فیل‌ماهی جدا نمودند که نتایج این تحقیق در خصوص اثرات مثبت پربیوتیک تایید می‌نماید.

طبق گزارش Gatesoupe (۱۹۹۹)؛ Verschuere و همکاران (۲۰۰۰)؛ Irianto و Austin (۲۰۰۰) افزایش تعداد باکتری پروبیوتیک در روده ماهی می‌تواند از طریق تحریک سیستم ایمنی میزبان باعث افزایش مقاومت آن در برابر استرس‌های محیطی شود که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. نتایج به‌دست آمده توسط Castex و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* درخصوص تقویت ایمنی، کاهش عفونت در برابر مواجه با پاتوژن و کاهش تلفات در میگو *Litopenaeus stylirostris* نیز یافته‌های تحقیق حاضر را تایید می‌نماید. لذا افزایش میزان باکتری در روده ماهیان تغذیه شده با باکتوسل و مانان اولیگوساکارید به عنوان محرک را در این تحقیق می‌توان دلیل اصلی افزایش مقاومت ماهیان قزل‌آلا در برابر تنش‌های دمایی و هیپوکسی در نظر گرفت.

تاثیر معنی‌دار پربیوتیک مانان الیگوساکارید در بهبود عملکرد رشد، بازماندگی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در ماهی و سخت‌پوستان توسط Staykov و همکاران (۲۰۰۷)؛ Salze و همکاران (۲۰۰۸)؛ Sang و همکاران (۲۰۰۹)؛ Torrecillas و همکاران (۲۰۱۲)؛ Zhang و همکاران (۲۰۱۲) از طریق افزایش ایمنی، حفظ آلوستاسیس و درنتیجه بهبود سازش‌پذیری آن‌ها در برابر تغییرات محیطی نیز یافته‌های تحقیق حاضر را تایید می‌نماید. به‌طورکلی فرآورده‌های پروبیوتیک سبب افزایش میزان مقاومت و بقاء ماهیان نسبت به انواع استرس‌ها می‌گردد و بدین صورت به بهبود وضعیت سلامتی و رشد بهتر ماهیان کمک می‌کند. لذا با توجه به نتایج حاصل و ظرفیت بالقوه پروبیوتیک باکتوسل و پربیوتیک مانان الیگوساکارید، افزودن ۵ گرم مانان اولیگوساکارید به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک باکتوسل جهت بهبود کیفی ماهی‌قزل‌آلای رنگین‌کمان و افزایش مقاومت آن در برابر استرس‌های محیطی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این بررسی، مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان و دانشکده منابع‌طبیعی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

منابع

۱. **اکرمی، ر.؛ حاجی‌مرادلو، ع.؛ متین‌فر، ع.؛ عابدیان کناری، ع. و علی محمدی، ا.، ۱۳۸۷.** اثرات سطوح متفاوت پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، تغذیه، نرخ بازماندگی و ترکیب بدن فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد۱۵، شماره۵، صفحات ۵۵ تا ۶۷.

۲. **آذری‌تاکامی، ق.؛ مشکینی، س.؛ رسولی، ع. و امینی، ف.، ۱۳۸۴.** بررسی اثرات تغذیه‌ای ناپلئوس‌های *Artemia urmiana* غنی شده با ویتامین C روی رشد، درصد بقاء و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۶۶، صفحات ۲۵ تا ۳۲.

۳. **پورامینی، م. و حسینی‌فر، ح.، ۱۳۸۶.** کاربرد پروبیوتی‌ها و پربیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. انتشارات موج سبز. تهران. ۱۰۴ صفحه.

۴. **رحمتی‌اندانی، ه.ر.؛ تکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۸۹.** بهبود مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقابله *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* و *لاکتوباسیل* جدا شده از روده کپورمعمولی. مجله دامپزشکی ایران. سال ۷، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۵.

۵. **کریم‌زاده، ص.؛ یانسری، ا.ت.؛ کریم‌زاده، ق.؛ منیعی، م. و حمیدی، م.، ۱۳۸۸.** فواید و کاربرد پروبیوتیک‌ها در تغذیه دام، طیور و آبزیان. انتشارات آوای مسیح. ساری. ۱۷۶ صفحه.

۶. **کریم‌زاده، ص.؛ نادری، ع. و اسماعیلی‌ملا، ع.، ۱۳۹۱.** فواید و کاربرد پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری. انتشارات پرتو واقعه. ۱۶۸ صفحه.

۷. **Amar, E.C.; Kitron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T., ۲۰۰۰.** Effect of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science. Vol. ۶۶, pp: ۱۰۶۸-۱۰۷۵.

۷. **Browdy, C., ۱۹۹۸.** Recent developments in penaeid brood stock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture. Vol. ۱۶۴, pp: ۳-۲۱.

۸. **Cahill, M.M., ۱۹۹۰.** Bacteria flora of fishes: a review. Microbial Ecology. Vol. ۱۹, pp: ۲۱-۴۱.

۹. **Castex, M.; Lemaire, P.; Wabete, N. and Chim, L., ۲۰۱۰.** Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defense and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۸, pp: ۶۲۲-۶۳.

۱۰. **David, J.A.; Jenkiss, C.W.C. and Vladimir, V., ۱۹۹۹.** Inulin, oligofructose and intestinal function. Journal of Nutrition. Vol. ۱۲۹, pp: ۱۴۳۱-۱۴۳۳.

۱۱. **Dimitroglou, A.; Merrifield, D.L.; Spring, P. and Sweeetman, J., ۲۰۱۰.** Effect of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. Vol. ۳۰, pp: ۱۸۲-۱۸۸.

۱۲. **Fuller, R., ۱۹۸۹.** A review: probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. Vol. ۶۶, pp: ۳۶۵-۳۷۸.

۱۳. **Gatesoupe, F.J., ۱۹۹۹.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. Vol. ۱۸۰, pp: ۱۴۷-۱۶۵.

۱۴. **Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B., ۱۹۹۵.** Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. Vol. ۱۲۵, pp: ۱۴۰۱-۱۴۱۲.

۱۵. **Gomez-Gill, B.M.A.; Herrera–Vega, F.A.; Abreu-Grobois, B. and Roque, A., ۱۹۹۸.** Bioencapsulation of two different Vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Applied Environmental Microbiology. Vol. ۶۴, pp: ۱۸-۲۲.

۱۶. **Irianto, A. and Austin, B., ۲۰۰۲.** Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease. Vol. ۲۵, pp: ۶۳۳-۶۴۲.

۱۷. **Li, P. and Gatlin, D.M., ۲۰۰۵.** Evaluation of the prebiotic Grobitic-A and brewers' yeast as dietary supplement for sub-adult hybrid Striped bass (*Moron crypsos×M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture. Vol. ۲۴۸, pp: ۱۹۷-۲۰۵.

۱۸. **Mahious, A.S. and Ollevier, F., ۲۰۰۵.** Probiotic and Prebiotics in Aquaculture: Review. ۱. st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for

Use in Larviculture (Urmia, Iran). pp: ۱۷-۲۶.

۱۹. **Merrifield, D.; Bardley, G.; Baker, R. and Davies, S., ۲۰۰۹.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbum). Aquaculture Nutrition. Vol. ۱۷, No. ۱, pp: ۷۳-۷۹.

۲۰. **Ringo, E. and Gatesoupe, F.J., ۱۹۹۸.** Lactic Acid Bacteria in fish: a review. Aquaculture. Vol. ۱۶۰, pp: ۱۷۷-۲۰۳.

۲۱. **Salze, G.; McLean, E.; Schwarz, M.H. and Craig, S.R., ۲۰۰۸.** Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture. Vol. ۲۷۴, pp: ۱۴۸–۱۵۲.

۲۲. **Sang, H.M.; Trung, K.Y.L. and Fotedar, R., ۲۰۰۹.** Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, ۱۹۱۲) when challenged with different stressors. Fish and Shellfish Immunology. Vol, ۲۷, pp: ۳۴۱-۳۴۸.

۲۳. **Staykov, Y.; Spring, P.; Denev, S. and Sweetman, J., ۲۰۰۷.** Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International. Vol. ۱۵, pp: ۱۵۳-۱۶۱.

۲۴. **Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, D.; Robaina, L.; Real, F.; Sweetman, J.; Tort, L. and Izqueirdo, M.S., ۲۰۰۷.** Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۳, pp: ۹۶۹-۹۸۱.

۲۵. **Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Dhanasiri, A.K.S.; Sweetman, J. and Izquierdo, M.S., ۲۰۱۲.** Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. Journal of Fish Diseases. Vol. ۳۵, No. ۸, pp: ۵۹۱–۶۰۲.

۲۶. **Verschuere, L.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., ۲۰۰۰.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. ۶۴, pp: ۶۵۵-۶۷۱.

۲۷. **Zhang, J.; Liu, Y.; Tian, L.; Yang, H.; Liang, G. and Xu, D., ۲۰۱۲.** Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۳۳, No. ۴, pp: ۱۰۲۷-۱۰۳۲.

Effect of dietary commercial probiotic (Bactocell) and Manan Oligosaccharide prebiotic on tolerance of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against oxygen and temperature stresses

- **Rezvaneh Jenabi Haghparast*:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, P.O.Box: 57153-165, Urmia, Iran
- **Saeed Meshkini:** Department of food hygienic and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, P.O.Box: 57153-165, Urmia, Iran
- **Amir Tukmechi:** Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, P.O.Box: 57153-165, Urmia, Iran

Received: July 2013 Accepted: October 2013

Key words: Rainbow Trout, Bactocel, Manan Oligosaccharide, Stresses

Abstract

In this study, the resistance of rainbow trout was assayed after feeding with a commercial probiotic (Bactocel®) and Manan Oligosaccharide prebiotic in challenging with hypoxia and temperature stresses. 720 fish with average initial weight of 10±2 g under 6 feeding treatments (in 3 replicates) were tested: 1) feeding with commercial food (control), 2) feeding on 100 mg Bactocel/kg feed, 3) feeding on 2.5 g Manan oligosaccharide/kg feed, 4) feeding on 5 g Manan oligosaccharide/kg feed, 5) feeding on 100 mg Bactocel and 2.5 g Manan oligosaccharide/kg feed, 6) feeding on 100 mg Bactocel and 5 g Manan oligosaccharide/kg feed. The results showed that intestine of fish fed on both probiotic and prebiotic contained significantly higher number of probiotic bacteria. Minimum mortality under temperature stress was observed in treatments fed on both probiotic and prebiotic ($P<0.05$) and maximum tolerance to anoxia stress was detected in treatments 4 and 6, significantly higher compared to control group.

* Corresponding Author's email: rezvanehjenabi@yahoo.com