



اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) بر فعالیت ضدباکتریایی و برخی شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*)

زهرا روستا^{۱*}، عبدالمجید حاجی مرادلو^۱، سید حسین حسینی فر^۱، فرزانه وکیلی^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

تاریخچه مقاله:

موکوس اپیدرمی ماهی و ترکیبات آن اولین خط دفاعی در برابر پاتوژن‌ها می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی تایگر بارب بود. تعداد ۶۳۰ قطعه بچه ماهی (۳/۰ ± ۵/۰ گرم) به طور تصادفی در سه تیمار با سه تکرار در آکواریوم‌ها توزیع شده و با ۳ جیره آزمایشی حاوی صفر، 1.5×10^8 و 3×10^8 CFU/ml پروبیوتیک به مدت ۹۰ روز غذایی شدند. در پایان دوره از ماهی‌ها موکوس‌گیری و فعالیت ضدباکتریایی آن به روش‌های انتشار دیسک و رقت‌های متوالی در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای *Streptococcus faecium* و *Escherichia coli* اندازه‌گیری شد. قطر هاله عدم رشد، توسط موکوس ماهی با افزایش غلظت پروبیوتیک جیره در مقابل هر دو باکتری افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). در روش رقت‌های متوالی موکوس، نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. همچنین تغذیه ماهی‌ها با پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئین محلول گردید ($P < 0.05$). نتایج این آزمایش نشان داد که موکوس ماهی تایگر بارب در برابر هر دو پاتوژن فعالیت ضدباکتریایی داشته و استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌دار در فعالیت ضدباکتریایی موکوس، پروتئین محلول و آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی این ماهی نسبت به تیمار شاهد شده است.

دریافت: ۹۲/۱۰/۲۶

اصلاح: ۹۲/۱۲/۲۰

پذیرش: ۹۳/۰۱/۱۶

کلمات کلیدی:

ضدباکتریایی،

ایمنی موکوسی

پروبیوتیک

آلکالین فسفاتاز

مقدمه

بهبود شرایط غذایی و میکروبی می‌تواند باعث سازگاری اکولوژیکی، رشد بهتر و کاهش تلفات در طی دوره پرورش آبزیان گردد (Olsen and Ringo, 1999). اخیراً، به کارگیری مواد محرک سیستم ایمنی در صنعت آبزی پروری، برای بهبود و تحریک فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا عمومیت یافته است. این مواد به صورت مکمل‌هایی به غذاهای مصنوعی افزوده می‌شوند و برای جلوگیری از گسترش بیماری‌ها و افزایش کارایی ضریب تبدیل غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hoseinifar et al., 2013). در ماهی، مکمل‌های غذایی مختلف با خواص محرک سیستم ایمنی مانند

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Roosta6787@gmail.com

پروبیوتیک‌ها (Wang, 2007)، مواد تولید شده توسط باکتری‌ها و ترکیبات گیاهی، می‌توانند به طور مستقیم مکانیسم‌های دفاعی اولیه را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند (Bricknell and Dalmo, 2005). تحریک سیستم ایمنی (Bricknell and Dalmo, 2005)، اثرات ضدباکتریایی، نظیر تولید آنتی بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، سیدروفورها، لیزوزی، پروتئاز، پراکسید هیدروژن، تغییر مقدار pH و توالی اسیدهای آلی (اسید فرمیک، اسید استیک، اسید لاکتیک) می‌باشد (Verschuere *et al.*, 2000) و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و بهبود رشد (احمدنیا و همکاران، ۱۳۹۲) از جمله مزایای شناخته شده پروبیوتیک‌ها می‌باشند.

باکتری‌کش‌ها ترکیباتی پروتئین دار هستند که باکتری‌ها را از بین برده یا موجب مهار آن‌ها می‌گردند. ارگانوسم‌های گوناگونی این ترکیبات را تولید می‌کنند مانند لاکتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، کارنوباکتریوم، انتروکوکوس و باسیلوس که قادر به تولید ترکیبات مهارکننده هستند (Branby, 1992). پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یک گونه از هشت جنس اصلی لاکتوباسیلوس است و شاید شناخته شده ترین گونه در بین لاکتوباسیلوس‌ها باشد (Buttris-Smith, 1997).

پاسخ اولیه به هجوم عوامل بیماری‌زا، دفاع اولیه است که اجزای کلیدی آن شامل لایه موکوس روی پوست، آبشش‌ها و مجرای معده-روده‌ای و اجزای تشکیل دهنده خون شامل سلول‌های کشنده‌ی طبیعی و فاگوسیت‌ها می‌باشد (Anbarasu and Chandran, 2001). هرگونه اختلال در ویژگی‌های تشریحی و فیزیولوژیکی پوست موجب گسترش بیماری‌های پوستی شده که بخش قابل ملاحظه‌ای از بیماری‌ها و مرگ و میرها را در آبزیان سبب می‌شود (Iger and Abraham, 1990). نقش آنزیم‌های موکوس اپیدرم در سیستم ایمنی غیراختصاصی برخی ماهیان آکواریومی از جمله ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)، گربه ماهی (*Clarias batrachus*)، پنگوسی گوستخوار (*Pangasius sanitwangse*)، ماهی قرمز (*Carassius auratus*) گزارش شده است (حاجی مرادلو و همکاران، ۱۳۹۱).

ماهی تایگر بارب از خانواده کپور ماهیان (*Cyprinidae*) و همه چیزخوار است. این گونه جزو ماهیان مهم منطقه‌ی جنوب شرقی آسیا بوده و به منظور احیاء مناطقی که این گونه در آنجا حذف شده، در این نواحی مورد پرورش قرار گرفته است (Ng and Tan, 1997).

پروبیوتیک‌ها و محرک‌های ایمنی می‌توانند بر ایمنی موکوسی تأثیر گذار باشند. Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲b) تأثیر پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* را بر شاخص‌های ایمنی موکوسی در قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نموده و افزایش معنی‌دار فعالیت ضدباکتریایی موکوس علیه باکتری بیماری‌زای *Yersinia ruckeri* در تیمار تغذیه شده با مخمر را گزارش کردند. علی‌رغم انجام مطالعات گسترده در زمینه پروبیوتیک‌ها و اثبات نقش باکتری اسید لاکتیک (Lactic acid bacteria) در بهبود تعادل جمعیت میکروبی روده میزبان و افزایش کارایی تغذیه (Ringo and Gatesoupe, 1998)، اطلاعات محدودی در ارتباط با اثرات پروبیوتیک‌ها در ایمنی موکوسی به خصوص در مورد ماهیان آکواریومی گزارش شده است. لذا در این مطالعه اثرات پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی فاکتورهای ایمنی موکوس اپیدرم ماهی تایگر بارب بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی تیمارها

در این آزمایش از ۶۳۰ قطعه بچه ماهی تایگر بارب با میانگین وزنی 3 ± 0.5 گرم استفاده شد. ماهیان به مدت ۲ هفته سازگار شده و سپس در ۹ آکواریوم (سه تیمار صفر، $1/5 \times 10^8$ و 3×10^8 در سه تکرار) با تراکم ۷۰ ماهی نگهداری شدند. شاخص‌های کیفی آب طی دوره پرورش دمای آب 2 ± 23 درجه سانتیگراد، pH ۷-۸ و اکسیژن محلول ۹ میلی گرم در لیتر بود.

تهیه غذا و غذادهی

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت لیوفیلیزه (انجماد خشک) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. پس از رقیق سازی با آب پیتونه، باکتری به صورت خطی در محیط کشت MRS (Merck, Germany) کشت داده شد. باکتری‌ها به لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع عمومی براث (Soy broth) تزریق و تا رسیدن به غلظت مناسب در انکوباتور قرار گرفتند. غلظت‌های صفر، $1/5 \times 10^8$ و 3×10^8 CFU/ml بر مبنای نیم مک فارلند و با قرائت نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و به غذای دست ساز (جدول ۱) اضافه و در ظروف در بسته به مدت ۱ هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و ماهیان به مدت ۱۲ هفته مورد تغذیه قرار گرفتند.

جدول ۱. ترکیب جیره غذایی پایه مورد استفاده

ویتامین	مکمل	پودر ماهی	آرد جو	آرد گندم	آرد ذرت	آرد سویا	میزان ترکیب جیره (درصد)
۱	۱	۷	۱۵	۱۵	۳۶	۲۵	

جمع آوری موکوس

موکوس ماهیان با استفاده از روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) با کمی اصلاحات، جمع آوری شد. غذادهی ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری قطع شد. در پایان دوره از هر آکواریوم ۳۰ قطعه ماهی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۵ میلی گرم در لیتر) به منظور به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، درون آب سرد و تمیز وارد شده و بلافاصله به صورت انفرادی درون کیسه‌های زیپ پلاست حاوی ۱۰ میلی لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی مولار قرار گرفتند. پس از مدت زمان دو دقیقه ماهیان به آکواریوم با اکسیژن مناسب منتقل شدند. موکوس از کیسه‌ها جمع آوری و مایع رویی آن در آزمایشگاه پس از سانتریفیوژ $1500 \times g$ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به دست آمد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) موکوس

باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید که شامل باکتری گرم مثبت *Streptococcus faecium* (PTCC 1238) و باکتری گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 1554) بود. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع، به منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی موکوس، از روش انتشار دیسک (Hellio et al., 2002) با کمی اصلاحات و اندازه گیری قطر هاله ی عدم رشد استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند روی سطح محیط کشت نوترینت آگار به صورت یکنواخت گسترده شد. همزمان دیسک بلانک‌های استریل (۷ میلی متر) آغشته به ۲۰۰ میکرولیتر نمونه موکوس با فاصله روی محیط کشت قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. قطر هاله عدم رشد با کولیس اندازه گیری شد. این آزمایش برای هر سویه سه بار تکرار گردید. کمترین غلظت بازدارندگی موکوس (MIC) نیز با روش رقت‌های متوالی میکرودیولوشن در چاهک‌های ۹۶ خانه انجام گرفت. رقت‌های موکوس در نظر گرفته شده ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکرولیتر در میلی لیتر بود. پس از ۴ ساعت با مشاهده ی میزان جذب نوری و کدورت، رشد یا عدم رشد باکتری بررسی شد.

سنجش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی

برای اندازه گیری پروتئین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. اندازه گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد

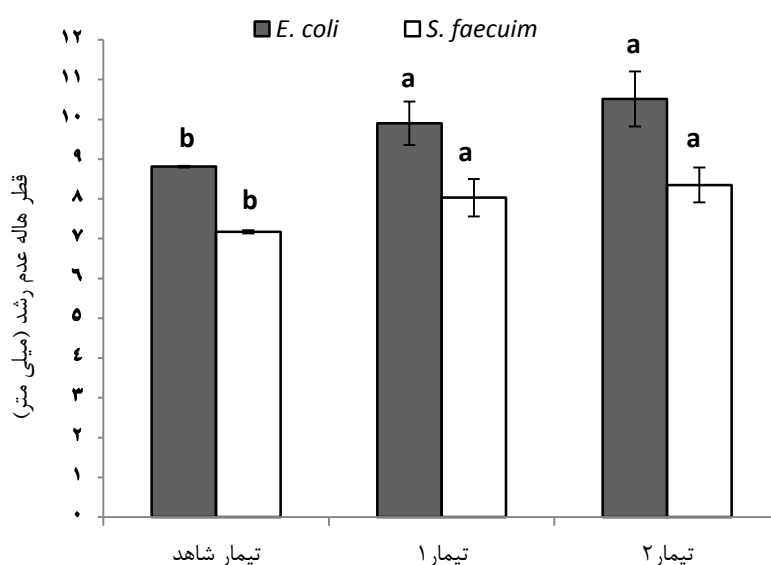
و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom, Libera S12) انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت های تولید شده توسط شرکت پارس و دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه تعیین گردید.

آنالیزهای آماری

در این آزمایش، نمونه گیری ماهیان در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. پس از بررسی هموزنی و واریانس و نرمال بودن داده ها، تفاوت میانگین داده های به دست آمده از تیمارها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه One-way-ANOVA و تست Duncan در سطح معنی داری (۰/۰۵) و با استفاده از نرم افزار SPSS 18.00 بررسی گردید.

نتایج

فعالیت ضدباکتریایی موکوس با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، در برابر باکتری استافیلوکوکوس فاسیوم و اشرشیا کلی تفاوت معنی داری (۰/۰۵) بین تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و گروه شاهد نشان داد، اگر چه بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک تفاوت معنی دار دیده نشد (۰/۰۵) (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه‌ی فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی تایگر بارب تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک (شاهد)، $1/5 \times 10^7$ (تیمار ۱) و 3×10^7 (تیمار ۲). ستون های مربوط به هر باکتری مشخص شده با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است.

نتایج مربوط به کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) موکوس در جدول ۲ آمده است. غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر در برابر هر دو نوع باکتری دارای حداقل خاصیت ضدباکتریایی بود و با رقیق شدن موکوس فعالیت ضدباکتریایی آن کاهش یافت. در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک، MIC در برابر باکتری اشرشیا کلی به صورت واضح کاهش یافت.

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) موکوس ماهی تایگر بارب در برابر باکتری های اشرشیا کلی و استرپتوکوکوس فاسیوم

<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	غلظت پروبیوتیک (CFU/ml)
MIC(μl/ml)	MIC(μl/ml)	
+ ۲۰۰	+ ۲۰۰	صفر
+ ۱۰۰	- ۱۰۰	
- ۵۰	- ۵۰	
- ۲۵	- ۲۵	
- ۱۲/۵	- ۱۲/۵	
+ ۲۰۰	+ ۲۰۰	۱/۵×۱۰ ^۸
+ ۱۰۰	- ۱۰۰	
+ ۵۰	- ۵۰	
+ ۲۵	- ۲۵	
- ۱۲/۵	- ۱۲/۵	
+ ۲۰۰	+ ۲۰۰	۳×۱۰ ^۸
+ ۱۰۰	+ ۱۰۰	
+ ۵۰	- ۵۰	
+ ۲۵	- ۲۵	
- ۱۲/۵	- ۱۲/۵	

+ نشان دهنده وجود و - نشان دهنده عدم وجود خاصیت ضدباکتریایی غلظت های موکوس در برابر باکتری های مورد بررسی است.

نتایج به دست آمده از سطوح پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس در ماهی تایگر بارب تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (جدول ۳) نشان دهنده افزایش معنی دار در میزان پروتئین محلول در تیمارهای آزمایشی (۰/۰۵ P) با افزایش سطح پروبیوتیک بود. همچنین در موکوس ماهی تایگر بارب تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی افزایش معنی دار در مقایسه با جیره شاهد نشان داد (۰/۰۵ P). اگرچه فعالیت این آنزیم بین موکوس تیمارهای حاوی پروبیوتیک دارای تفاوت معنی دار نبود (۰/۰۵ $P>$). با افزایش سطح پروبیوتیک جیره روند افزایشی در میزان پروتئین و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس مشاهده گردید.

جدول ۳. میانگین (± انحراف معیار) میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

سطوح متفاوت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (CFU/ml)			
۳×۱۰ ^۸	۱/۵×۱۰ ^۸	صفر	
۰/۳۹ ± ۰/۰۲ ^a	۰/۱۹ ± ۰/۰۲ ^b	۰/۱۱ ± ۰/۰۱ ^c	پروتئین محلول (mg/ml)
۲۲ ± ۲/۷ ^a	۱۹ ± ۴/۷ ^a	۱۰ ± ۴/۳ ^b	آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی (IU/l)

اعداد با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشد.

بحث

موکوس به عنوان جزئی از مکانیسم ایمنی ذاتی علاوه بر اینکه با ریختن پوست و بافت مرده و تولید مداوم آن، همیشه وجود دارد، از اتصال پاتوژن‌ها نیز جلوگیری می‌کند. همچنین موکوس ماهی منبع مهمی از اجزاء دخیل در سیستم ایمنی غیراختصاصی شامل لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان (عامل مکمل)، لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش دهنده C و دیگر پروتئین‌ها و لیپیدهای آنتی باکتریال می‌باشد (Subramanian *et al.*, 2007). کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای ژنتیکی مربوط به گونه ماهی، سن، تغذیه، فاکتورهای محیطی و وجود یا عدم وجود فاکتورهای استرس‌زا در قبل یا در زمان نمونه برداری موکوس است (سلطانی، ۱۳۷۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد به کارگیری سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره ماهی تایگر بارب به طور معنی داری فعالیت آنتی باکتریایی موکوس را افزایش می‌دهد. همراستا با این نتایج Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲b) افزایش معنی داری در فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی قزل آلائی رنگین کمان با افزودن محرک ایمنی ساکارومایسس سروریا مشاهده کردند. Panigrahi و همکاران (۲۰۰۴) نیز با به کارگیری پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* در جیره ماهی قزل آلا افزایش معنی داری را در فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت فاگوسیتیک بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده کردند. همچنین در مطالعات پیشین اثرات مثبت گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر عملکردهای رشد و سیستم ایمنی در باس دریایی (Carnaveli *et al.*, 2006) و تیلاپیای هیبریدی (Lee *et al.*, 2012) گزارش شده است.

در خصوص حساسیت سویه‌ها به مواد دارای خواص ضد باکتریایی در موکوس ماهیان نیز Subramanian و همکاران (۲۰۰۸) پس از بررسی اثرات ضد باکتریایی موکوس گونه‌های مختلفی از ماهیان در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها به روش رقت‌های متوالی نشان دادند که باکتری اشرشیا کلی نسبت به سایر سویه‌ها حساسیت بیشتری دارد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (شکل ۳). Vennila و همکاران (۲۰۱۱) به روش انتشار دیسک و Naravaez و همکاران (۲۰۱۱) به روش میکرودیوشن، به ترتیب فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهیان گرمسیری و ماهی آزاد را مورد بررسی قرار دادند. در همه گزارش‌ها بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس تأکید شده است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد.

آنزیم فسفاتاز قلیایی به دلیل فعالیت هیدرولیتیکی به عنوان یک عامل ضدباکتریایی ضروری شناخته شده و عملکرد محافظتی در بهبود زخم، عفونت انگلی و استرس‌ها دارد (Iger and Abraham, 1990). اطلاعات محدودی در رابطه با تاثیر محرک‌های ایمنی بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موجود در موکوس ماهیان وجود دارد. Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲a) افزایش معنی داری را در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس در ماهی قزل آلائی رنگین کمان تحت تیمار محرک ارگوسان گزارش کردند. در این آزمایش نیز، افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در موکوس ماهی تایگر بارب پس از ۱۲ هفته تغذیه با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مشاهده گردید.

سلول‌های کیسه‌ای شکل در اپیدرم ماهیان، با ترشح پروتئین‌هایی ماهیان را در برابر عفونت‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند. لکتین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها از جمله پروتئین‌هایی با باندهای کربوهیدراتی هستند که به همراه فاکتورهای دیگر موکوس به هنگام هجوم پاتوژن‌ها نقش آگلوتینه کردن آنها را برعهده دارند (Suzuki *et al.*, 2003). نتایج این مطالعه حاکی از افزایش میزان پروتئین محلول موکوس در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک بود. افزایش سطوح پروتئین محلول موکوس در اثر به کارگیری مکمل‌های غذایی در مطالعات پیشین گزارش شده است. افزودن ویتامین A به جیره‌ی غذایی ماهی کلمه سبب افزایش معنی دار در میزان پروتئین محلول موکوس نسبت به تیمار شاهد گردید (شریفیان، ۱۳۹۲). همچنین استفاده از محرک ایمنی ساکارومایسس سروریا نیز سبب افزایش سطوح پروتئین محلول موکوس شد (Sheikhzadeh *et al.*, 2012b). افزایش پروتئین محلول نشان دهنده بیشتر بودن اجزاء دخیل در سیستم ایمنی با ساختار

پروتئینی در ماهی‌هایی است که با پروبیوتیک تغذیه شدند که این مورد نیز از طریق بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی موکوس در این مطالعه نشان داده شده است.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان پروبیوتیک سبب افزایش ایمنی موکوسی در ماهی تایگر بارب می‌شود. با توجه به تراکم و بسته بودن محیط آکواریوم امکان بروز بیمارهای پوستی در این ماهیان بیشتر است. لذا افزایش ایمنی موکوسی از طریق کاهش ریسک ابتلا به بیماری می‌تواند اثرات سودمندی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی دریغ آقای مهندس محمدرضا وکیلی مدیر کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی «گرگان ماهی» و پرسنل محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که در اجرای این تحقیق ما را یاری نموده اند قدردانی می‌گردد.

منابع

- Ahmednia M., R. Farhngi, M. R. Fieci, G. Nuri, F. 1392. تأثیر استفاده از سطوح مختلف باکتری *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، ترکیب لاشه و بقاء در آرتمیا ارومیا. شیلات. شماره ۶۵، صفحات ۳۵۳-۳۶۴.
- Haji Mradloo, E., قربانی، ر.، ابولفتحی، م. ۱۳۹۱. مطالعه مقایسه‌ای فعالیت آنزیم‌های موکوس پوست (لیزوزیم، تریپسین و فسفاتاز قلیایی) چهار گونه ماهی آکواریومی. گزارش طرح پژوهشی. دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- Saltani, M. 1377. ویژگی‌های ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۱ و ۲، صفحات ۳۱-۳۴.
- Shirifian, M. 1392. تأثیر سطوح متفاوت ویتامین A بر خصوصیات ضدباکتریایی موکوس اپیدرم ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده شیلات و محیط زیست. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- Anbarasu, K., Chandran., M. 2001. Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish (*Mystus gulio*)(Hamilton), to different bacterins of (*Aeromonas hydrophila*). Fish and Shellfish Immunology. 11: 347-355.
- Branby-Smith, F.M. 1992. Bacteriocins: application in food preservation. Food Science and Echnology. 3: 133-137.
- Buttris, J. 1997. Nutritional properties of fermented milk products. International Journal of Dairy Technology. 50: 21-27.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology.19: 457-472.
- Carnaveli, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European Sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture. 258: 430-438.
- Hellio, C., Pons, A.M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., Gal, Y.L. 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. International Journal of Antimicrobial Agents. 20: 214-219.
- Hoseinifar, SH., Khalili, M., Khoshbavar Rostami, H., Esteban, M. 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish and Shellfish Immunology. 35: 1416-1420.
- Iger, Y., Abraham, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology. 36: 421-437.

- Lee, J.S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S.J., Kim, J.C., Rhee, M.H., Suh, J.W., Park, S.C. 2012. Effects of dietary supplementation of (*Lactobacillus pentosus*) PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel (*Anguilla japonica*) challenged with (*Edwardsiella tarda*). *Fish and Shellfish Immunology*. 34(3): 756-61.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Narvaez, E., Berendsen, J., Guzman, F., Gallardo, G.A., Mercado, L. 2011. An immunological method for quantifying antibacterial activity in Salmosalar (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish and Shellfish Immunology*. 28: 235-239.
- Ng, P.K., Tan H. 1997. Freshwater fishes of Southeast Asia: potential for the aquarium fish trade and conservation issues. *Aquarium Sciences and Conservation*. 1: 79-90.
- Olsen, R., Ringo, E. 1999. Dominance hierarchy formation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): nutrient digestibility of subordinate and dominant fish. *Aquaculture Research*. 30: 667-671.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, H., Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) induced by a potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102: 379-388.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish (review). *Aquaculture*. 160:177-203.
- Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M., Akbari., M. 2012^a. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immuno response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 1083-1087.
- Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M., Akbari., M. 2012^b. Hilyses, Fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 407-410.
- Subramanian, S., Ross, N.W., MacKinnon, Sh.L. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 15: 85-92.
- Subramanian, S., MacKinnon, Sh.L., and Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148: 256-263.
- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 136: 723-730.
- Vennila, R., Kummur, K.R., Kanchana, Sh., Arumugam, M., Vijayalakshmi, Sh., Balasubramaniam, T. 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1(2): 239-243.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4): 655-671.
- Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 269: 259-264.