مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۴، ۳۸۲-۳۷۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,4:375-382, 2013

اثرات پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان اولیگوساکارید بر رشد و ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان

رضوانه جنابی حق پرست[۱] سعید مشکینی[۲] امیر توکمه چی[۳*]
۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه-ایران
۲) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه-ایران
۳) گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه-ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ فروردین ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۳۱ خرداد ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: افزایش جمعیت و تأمین غذا یکی از بزرگ‌ترین مشکلات جهان بوده و در این راستا پرورش آبزیان نقش مهمی را در تولید و تامین غذای مورد نیاز انسان ایفا می‌کند. **هدف:** هدف از این مطالعه ارزیابی اثر استفاده خوراکی پروبیوتیک تجاری باکتوسل و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید بر رشد و برخی از پارامترهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان بود. **روش کار:** برای این منظور ۷۲۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان (۱۰±۲g) در شش گروه هر کدام با سه تکرار بصورت تصادفی تقسیم شدند. ماهیان گروه اول (شاهد) فقط با غذای تجاری، گروه دوم پروبیوتیک (۱۰۰mg/k)، گروه سوم پری بیوتیک (۲/۵g/k)، گروه چهارم پری بیوتیک (۵g/k)، گروه پنجم (پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۲/۵g/k) و گروه ششم (پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۵g/k)، به مدت ۴۵ روز مورد تغذیه قرار گرفتند. سپس کلیه تیمارها به مدت ۱۵ روز غذای معمولی (فاقد پروبیوتیک و پری بیوتیک) را دریافت کردند. بررسی شاخص‌های رشد در روزهای صفر و ۶۰ و خونگیری و تهیه سرم برای آزمایش‌های ایمنی شناسی (فعالیت لیزوزیم، میزان آنتی بادی کل و فعالیت سیستم کمپلمان سرم) در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ انجام شد. **نتایج:** تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و پری بیوتیک دارای شاخص‌های رشد (درصد افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، شاخص وضعیت و نرخ رشد ویژه) بهتری در مقایسه با ماهیان شاهد بودند. همچنین نتایج نشان داد که شاخص‌های ایمنی در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و پری بیوتیک به صورت توام نسبت به سایر گروه‌ها، به صورت معنی‌داری ($p<0/05$) بیش‌تر بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** استفاده از پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان باعث بهبود رشد و پاسخ ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ، پروبیوتیک باکتوسل، شاخص‌های رشد، پارامترهای ایمنی، پری بیوتیک مانان الیگوساکارید، قزل آلای رنگین کمان

مقدمه

توسعه آبزی پروری کشور از اهمیت به سزایی برخوردار است. پرورش ماهیان، سخت پوستان، نرم تنان و جلبک‌ها یکی از روش‌های تولید غذا می‌باشد که به سرعت در حال توسعه است. قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از مهمترین گونه‌های تجاری آزاد ماهیان در ایران است. از نکات مهم در پرورش این ماهی اعمال مدیریت صحیح تغذیه و بالا بردن درصد بقاء است. در سال‌های اخیر آبزی پروری یکی از بخش‌های موثر در تولید غذا بوده و از چندین دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و رو به رشد تبدیل شده است. ولی در کنار این رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی نیز روبرو بوده که از جمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماریها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد. ثابت شده که در برخی از اجزاء غذایی مورد تغذیه جانوران، فلور باکتریایی دستگاه گوارش نقش مهمی در کارآیی تغذیه و سلامتی میزبان بر عهده دارد (۱۲). روش‌های مختلفی در جهت تعدیل و بهینه سازی فلور باکتریایی دستگاه گوارش به منظور دستیابی به ارتقاء عملکرد رشد، قابلیت هضم بیشتر، تحریک سیستم ایمنی، بازماندگی و مقاومت در برابر بیماریها در بسیاری از موجودات از جمله انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. باکتری‌های زیست‌یار به مجموعه‌ای از میکروب‌های زنده اطلاق می‌شوند که بکارگیری آنها اثرات سودمندی را در بهینه سازی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی آب سیستم‌های پرورش آبزیان دارد. استفاده از باکتری‌های انتخابی برای رشد و بهبود مناسب جمعیت میکروبی میزبان از جمله ایده‌های جدیدی می‌باشد که از طریق دستکاری جمعیت باکتریایی در آبزیان انجام می‌گیرد. واژه پروبیوتیک به معنی برای زندگی بوده که از زبان یونانی مشتق شده است. این واژه اولین بار به منظور توضیح مواد ترشحی به وسیله یک میکروارگانیسم که رشد یک میکروارگانیسم دیگر را تحریک می‌کند، به کار برده شد. امروزه پروبیوتیک‌ها را مکمل‌های غذایی میکروبی می‌دانند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده اثرات سودمندی بر میزبان دارند (۹).

Gibson و Roberfroid در سال ۱۹۹۵ اولین کسانی بودند که ایده پری بیوتیک‌ها را به شکل زیر تعریف نمودند «پری بیوتیک ماده غذایی غیر قابل 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». بر اساس این تعریف هر ماده غذایی که به روده می‌رسد مانند کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، بعضی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۲۹۵ نمابر: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۲۹۵ Email: atukmachi@urmia.ac.ir

از پپتیدها، پروتئین‌ها و نیز برخی از چربی‌ها می‌توانند به عنوان پری بیوتیک مطرح باشند. مهم‌ترین محصول حاصل از متابولیسم پری بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه هستند که از طریق اپی تلیوم روده جذب می‌شوند و به عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و سبب بهبود جذب مواد غذایی می‌شوند. تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه نظیر استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید لاکتیک ناشی از تخمیر پری بیوتیک، منجر به کاهش pH روده می‌شود که شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را فراهم می‌کند (۲۴). جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک نه تنها قادر هستند مواد مغذی ضروری مورد نیاز آبزیان را تامین کنند، بلکه می‌توانند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت و افزایش مقاومت آنها در برابر استرس و عوامل بیماری‌زا باشند (۱۱). همچنین مشاهده شده است که برخی از پروبیوتیک‌ها مانند باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک باعث افزایش اشتها، تقویت ایمنی و بهبود رشد آبزیان می‌گردند که این پدیده احتمالاً به دلیل افزایش قابلیت هضم مواد غذایی می‌باشد (۲۴). مطالعات اخیر نشان داده است که پروبیوتیک *Lactobacillus* به طور قابل توجهی باعث افزایش سرعت رشد و وزن بدن ماهی سیم دریایی (*Sparus auratus*) می‌شود، همچنین این پروبیوتیک باعث افزایش رشد و بقا در ماهی قزل آلای رنگین کمان شده است (۷).

Merrifield در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه رسید که استفاده از پروبیوتیک در جیره ماهی قزل آلا در افزایش کارایی غذایی، تعادل میکروبی روده و سلامتی و بازماندگی آنها موثر است (۲۰). همچنین استفاده از پری بیوتیک مانان (Bio-MOS®) منجر به افزایش رشد، بقاء و مقاومت باکتریایی در ماهیان کپور معمولی و قزل آلای رنگین کمان شده است. تحقیق دیگری نشان داد که وجود ۲٪ اینولین در جیره به طور معنی‌داری باعث تغییر فلور میکروبی مجرای معدی-روده‌ای در لارو ماهی توربوت (*Pestta maxima*) از طریق افزایش گونه‌های *Bacillus* تا ۱۴٪ و کاهش گونه‌های *Vibrio* می‌گردد (۲۲). اختلال در سیستم ایمنی ماهیان به واسطه عوامل استرس‌زای محیطی، منجر به حساسیت بیشتر به انواع بیماریها می‌شود که توسعه اقتصادی آبزی پروری را محدود می‌نماید. استفاده از مکمل‌های غذایی که در افزایش رشد و بالا بردن سیستم ایمنی نقش دارند و از جمله راهکارهایی می‌باشند که در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا می‌توانند مفید واقع شوند. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان به منظور جایگزینی با مواد ضد میکروبی شیمیایی بر شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی است.

مواد و روش کار

تهیه ماهی و طراحی آزمایش: در این بررسی تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۲g ± ۱۰ از یکی از مزارع تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا تهیه شد. جهت انتقال ماهی‌ها از تانکر مخصوص حمل ماهی (مجهز به کپسول اکسیژن) به آزمایشگاه استفاده گردید. ماهیان منتقل شده در تانک‌های ۱۰۰۰ لیتری (که قبلاً با فرمالین ضد عفونی شده بودند) رهاسازی شده و بلافاصله با محلول نمک ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند (۲۳). همچنین ماهی‌ها به لحاظ وجود انگل‌های خارجی و وجود بیماریهای احتمالی، مورد ارزیابی قرار گرفته و به مدت ۷ روز با شرایط آزمایشگاهی سازش یافتند. پس از طی دوره سازش ماهیان به شش گروه شامل: تیمار ۱ (شاهد)، تیمار ۲ (۱۰۰mg/kg غذا پروبیوتیک باکتوسل)، تیمار ۳ (۲/۵g/kg غذا پری بیوتیک مانان اولیگوساکارید)، تیمار ۴ (۵g/kg غذا پری بیوتیک مانان اولیگوساکارید)، تیمار ۵ (۱۰۰mg/kg غذا پروبیوتیک باکتوسل با ۲/۵g/kg غذا پری بیوتیک مانان اولیگوساکارید) و تیمار ۶ (۱۰۰mg/kg غذا پروبیوتیک باکتوسل با ۵g/kg غذا پری بیوتیک مانان اولیگوساکارید) و هر تیمار با سه تکرار تقسیم شدند. هر تکرار شامل ۴۰ قطعه ماهی بود و نحوه چیدن حوضچه‌ها به صورت بلوک‌های تصادفی انتخاب شد. تغذیه ماهیان بر اساس توده زنده و درجه حرارت آب و با استفاده از جدول غذادهی (۱۴) چهار وعده در روز و به مدت ۶۰ روز (۴۵ روز با پروبیوتیک و پری بیوتیک و ۱۵ روز پس از آن کلیه تیمارها با غذای فاقد پروبیوتیک و پری بیوتیک) صورت گرفت. آب مورد استفاده در این تحقیق از یک حلقه چاه تأمین گردید. در تمام دوره تحقیق، آب استخرهای حاوی ماهی جاری بوده و میانگین دما، شوری، pH و اکسیژن محلول استخرها به ترتیب ۱۴/۱°C، ۰/۵g/L، ۷/۶mg/L و ۱۰/۳ بود.

تهیه غذا: در این مطالعه پروبیوتیک تجاری باکتوسل (Bactocell) حاوی باکتری *Pediococus asidilactici* به میزان 1×10^{10} CFU/g از کمپانی Lallemand فرانسه، تهیه شد. همچنین پری بیوتیک مانان الیگوساکارید از شرکت تک فرآوری آریا خریداری گردید. برای افزودن آنها به غذای تجاری ابتدا غذای مورد نیاز هر تیمار به صورت جداگانه محاسبه و سپس مقادیر انتخاب شده از پروبیوتیک (۱۰۰mg) و پری بیوتیک (۲/۵g و ۵) در ۱۰mL سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون نموده و به همراهس ۵mL روغن مایع آفتابگردان بر روی غذا اسپری شد. سپس اجازه داده شد غذا به مدت دو 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 به صورت روزانه انجام شد.

زیست سنجی: به منظور بیومتری ماهیان، نمونه برداری در روزهای صفر و ۶۰ انجام شد. برای این منظور از هر تکرار ۱۰ ماهی به صورت تصادفی انتخاب و به کمک پودر گل میخک با دوز ۲۰۰mg/L بی هوش شدند. سپس طول کل بوسیله خط کش با دقت یک میلی متر و وزن آنها بوسیله ترازوی دیجیتال اندازه گیری و شاخص‌های رشد نظیر درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و شاخص وضعیت طبق فرمول‌های زیر مورد محاسبه قرار گرفتند (۱۵،۳۰):

۱۰۰× [میانگین وزن اولیه به گرم÷(میانگین وزن اولیه به گرم- میانگین وزن نهایی به گرم)] =وزن بدست آمده (درصد)

۱۰۰× [طول دوره پرورش÷(لگاریتم میانگین وزن اولیه به گرم- لگاریتم میانگین وزن نهایی به گرم)] =ضریب رشد ویژه (درصد)

۱۰۰× [^{3}(میانگین طول نهایی به سانتی متر)÷میانگین وزن نهایی به گرم] =شاخص وضعیت (درصد)

(افزایش وزن / غذای خورده شده) = ضریب تبدیل غذایی

سنجش پارامترهای ایمنی: در این بررسی فعالیت لیزوزیم، آنتی بادی کل و فعالیت سیستم کمپلمان سرم به عنوان پارامترهای پاسخ ایمنی در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ سنجیده شد. برای این منظور در هر مرحله زمانی از هر تکرار ۳ قطعه ماهی انتخاب گردید (۹ قطعه به ازاء هر تیمار) و نمونه‌های خون از ورید ساقه دمی ماهیان پس از بی هوشی اخذ و پارامترهای فوق به ترتیب زیر سنجیده شدند.

فعالیت لیزوزیم سرم: میزان لیزوزیم سرم بر اساس روش Clerton و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۴) Kim و Austin در سال ۲۰۰۶ (۱۷) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم، یعنی *Micrococcus lysodiekticus* اندازه‌گیری شد.

آنتی بادی کل سرم: آنتی بادی کل سرم با روش Siwicki و همکاران در سال ۱۹۹۴ اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا سرم با استفاده از محلول ۰/۸۵٪ کلرید سدیم به میزان یک دوم رقیق شده سپس مقدار پروتئین تام آن با روش رنگ سنجی برادفورد (۱۸) اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ایمونوگلبولین‌های سرم رسوب داده شد و در پایان با روش برادفورد مقدار پروتئین محلول رویی اندازه‌گیری و تفاوت بین مقدار آنتی بادی کل سرم با مقدار پروتئین محلول رویی عبارت است از میزان آنتی بادی کل سرم که بر حسب میلی گرم در میلی لیتر بیان گردید.

میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان سرم: فعالیت راه جایگزین کمپلمان بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش و به کمک روش Waley و North در سال ۱۹۹۷، Boesen و همکاران در سال ۱۹۹۹، Amar و همکاران در سال ۲۰۰۰ اندازه‌گیری شد (۱،۳،۲۹).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم افزار SPSS (نسخه ۱۷) و آزمون توکی (Tukey's Test) آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود)، استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<0/05$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

پس از ۶۰ روز بررسی، تأثیر استفاده همزمان پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید بر فاکتورهای رشد و تغذیه در قزل آلای رنگین کمان، مشخص گردید که مصرف پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید و مصرف توام این دو باعث بهترین وزن کل (۶۱±۳/۶۹g)، طول کل (۱۸/۵۰±۰/۵۰Cm) و ضریب تبدیل غذایی (۰/۹۰±۰/۱۱) در تیمار ۶ (ترکیب پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا)، بهترین ضریب رشد ویژه در تیمارهای ۴ (پری بیوتیک ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) (۱/۳۱±۰/۰۲٪)، ۵ (ترکیب پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۲/۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) (۱/۳۲±۰/۰۲٪) و ۶ (۱/۳۲±۰/۰۴٪)، بهترین درصد افزایش وزن در تیمارهای ۵ (۸۱/۶۹±۰/۵۱٪) و ۶ (۸۱/۶۸±۱/۰۷٪) و بهترین شاخص وضعیت بدنی در تیمارهای ۴ (۰/۹۵±۰/۰۴٪) و ۶ (۰/۹۶±۰/۰۳٪) شده است. در واقع این تأثیرات از نظر آماری با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری ($p<0/05$) را نشان دادند (جدول ۱).

در روز صفر هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان لیزوزیم بین تیمارهای مورد آزمایش وجود نداشت. در روز ۱۵ تیمارهای ۴ (پری بیوتیک مانان الیگوساکارید ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۶ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰mg و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) دارای بیشترین میانگین میزان لیزوزیم، به ترتیب ۲۷/۷۷μg/mL و ۲۸/۰۲ بوده ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار ندارد. در روز ۳۰ تیمار ۶ دارای بیشترین میانگین لیزوزیم (۳۴/۰۳ μg/mL) بوده و با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) می‌باشد. همچنین در روز ۴۵ تیمارهای ۴ و ۶ دارای بیشترین میانگین لیزوزیم به ترتیب ۳۶/۱۹ μg/mL و ۳۸/۹۲ بوده و با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) می‌باشند. در روز ۶۰ با أفت میانگین لیزوزیم، در همه تیمارها، هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید (نمودار ۱).

در روز صفر هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان ایمونوگلبولین تام بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید. میزان ایمونوگلبولین تام در همه تیمارها، در روز صفر در حدود ۳mg/mL بود. در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میزان میانگین ایمونوگلبولین تام تیمار ۶ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰mg و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) دارای اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) نسبت به سایر تیمارها می‌باشد. در روز ۴۵ تا ۶۰ با قطع مصرف پروبیوتیک و پری بیوتیک، افت میزان ایمونوگلبولین تام مشاهده گردید ولی همچنان تیمار ۶ دارای اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) نسبت به سایر گروه‌ها است (نمودار ۲).

در روز صفر و ۱۵ هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان کمپلمان بین تیمارهای مختلف وجود نداشت. در روز ۳۰ تیمار ۶ (ترکیب پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) با میزان ۷۲/۳۶ واحد در میلی لیتر اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) را با سایر گروه‌ها داشت. همچنین در روز ۴۵، تیمارهای ۴ (پری بیوتیک ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا)، ۵ (ترکیب پروبیوتیک ۱۰۰mg و پری بیوتیک ۲/۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) و ۶ (پروبیوتیک باکتوسل ۱۰۰mg و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید ۵g به ازاء هر کیلوگرم غذا) اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) را با سایر گروه‌ها داشت. در روزهای ۳۰ و ۴۵ تیمار ۶ دارای بیشترین میانگین فعالیت کمپلمان بود

جدول ۱. یافته‌های حاصل از زیست سنجی ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان به مدت ۶۰ روز. (*) داده‌های فوق به صورت Mean ± Standard Deviation نشان داده شده است. (*) حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنسی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

شاخص رشد	شاهد	باکتوسل	مانان ۲/۵	مانان ۵	باکتوسل و مانان ۲/۵	باکتوسل و مانان ۵
وزن نهایی (g)	۵۱/۱۹±۱/۵۷[a]	۵۵/۲۵±۱/۲۱[b]	۵۵/۷۵±۱/۳۸[b]	۵۹/۹۹±۱/۷۵[c]	۶۰/۲۲±۱/۷۱[c]	۶۱±۳/۶۹[c]
طول کل (Cm)	۱۶/۳۰±۰/۳۱[a]	۱۷/۴۷±۱[bc]	۱۷/۳۰±۰/۵۰[bc]	۱۸/۴۳±۰/۴۰[c]	۱۷/۴۶±۰/۱۵[bc]	۱۸/۵۰±۰/۵۰[c]
ضریب رشد ویژه (٪)	۱/۱۶±۰/۲۴[a]	۱/۲۵±۰/۰۱[b]	۱/۲۶±۰/۰۱[b]	۱/۳۱±۰/۰۲[c]	۱/۳۲±۰/۰۲[c]	۱/۳۲±۰/۰۴[c]
درصد افزایش وزن (٪)	۷۸/۵۰±۰/۶۷[a]	۸۰/۴۴±۰/۴۲[bc]	۷۹/۹۰±۰/۵۰[b]	۸۱/۴۸±۰/۵۳[c]	۸۱/۶۹±۰/۵۱[c]	۸۱/۶۸±۱/۰۷[c]
ضریب تبدیل غذایی (٪)	۱/۲۷±۰/۰۶[a]	۰/۹۷±۰/۰۶[b]	۰/۹۴±۰/۰۶[b]	۰/۹۱±۰/۰۲[b]	۰/۹۱±۰/۱۱[b]	۰/۹۰±۰/۱۲[b]
شاخص وضعیت بدنی (٪)	۱/۱۷±۰/۰۳[a]	۱/۰۴±۰/۱[ab]	۱/۱۳±۰/۰۷[ab]	۰/۹۵±۰/۰۴[a]	a۱/۱۳±۰/۰۱[b]	۰/۹۶±۰/۰۳

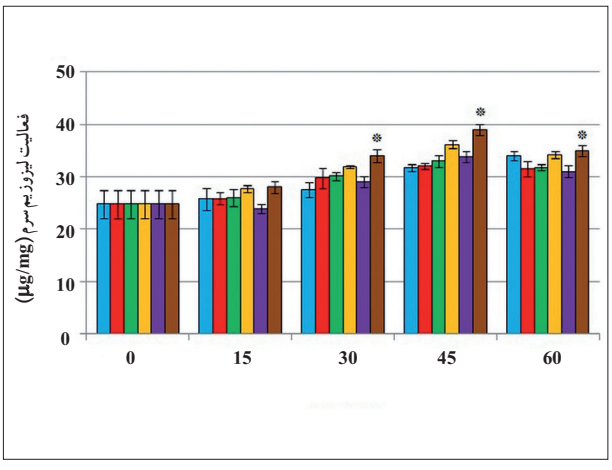
(نمودار ۳).

بحث

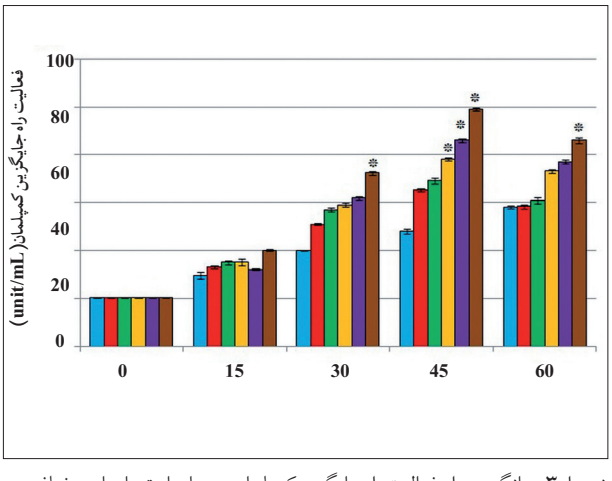
هدف همیشگی تولید آبزیان به حداکثر رساندن کارایی و بازده تولید برای حداکثرسوددهی است. جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها مواد مغذی ضروری را تامین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آنها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد. همچنین عملکرد پروبیوتیک‌ها در بهبود محیط آبی از طریق کاهش باکتری‌های بیماری‌زا است (۱۱). اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی، با دیدگاه‌های متفاوتی نظیر بهینه سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آنها، پیشگیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماریزا و همچنین ارتقاء عملکرد رشد آبزیان پرورشی در تحقیقات بی شماری توسط محققان شیلاتی تایید شده است (۱۶). بیشتر این تحقیقات منجر به ثبت نتایج با ارزشی شد که امروزه در سیستم‌های پرورشی به عنوان فنون کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳). اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و تحریک اشتها (۱۸)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش رشد، توسعه سطوح غذا (۲۰) و همچنین افزایش کیفیت آب و افزایش بقای موجود می‌شوند (۲۲). به کارگیری موثر پری بیوتیک‌ها در آبزیان نیازمند شناخت جمعیت و نوع میکروب‌های لوله گوارشی آبزیان می‌باشد. باکتری‌های ساکن روده قادرند به طور انتخابی پری بیوتیک‌ها را تخمیر کنند، تخمیر قندهای موجود در روده سبب افزایش انرژی و رشد این باکتری‌ها می‌شود که این مورد، باعث تقویت میکرو فلور روده‌ای و ممانعت از تشکیل کلنی باکتری‌های بیماریزا می‌گردد. این باکتری‌ها موادی ترشح می‌کنند که سبب تحریک دستگاه ایمنی می‌شود، از این رو سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماریزا می‌گردد (۸).

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های این تحقیق نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با تیمار شاهد در شاخص‌های رشد (وزن و طول) و شاخص‌های تغذیه‌ای (ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی) وجود دارد (p<۰/۰۵) و برخی از تیمارها داری شرایط بهتری هستند. در طی تحقیقی نشان داده شد که سویه *Pediococcus acidilactici* به عنوان پروبیوتیک، در ماهی قزل آلای رنگین کمان منجر می‌شود که ضریب تبدیل غذایی (FCR) کمتر از یک و نرخ رشد ویژه (SGR) بیشتر از دو باشد و میزان بقاء در گروه تغذیه شده با این پروبیوتیک بالای ۹۵٪ بود ولی در مقایسه با گروه شاهد که غذای بدون پروبیوتیک دریافت کرده بودند، هیچ پیشرفت رشدی مشاهده نشد (۲۲). مطالعات گذشته نشان داد که استفاده از سویه *Pediococcus acidilactici* در ماهی قزل آلا منجر به بهبود افزایش وزن شده است (۲). Merrifiel و همکاران در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه رسیدند که استفاده از پروبیوتیک در جیره ماهی قزل آلا در کاهش ضریب تبدیل غذایی، تعادل میکروبی روده و سلامتی و بازماندگی آنها موثر است (۲۱). Daniels در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی اثرات غنی سازی Artemia را در سطوح مختلف ۲، ۲۰ و ۲۰۰ قسمت در هزار مانان الیگوساکارید را در لابستر اروپایی (*Homarus gamarus*) مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند با افزودن مانان الیگوساکارید در سطوح ۲ و ۲۰ قسمت در هزار میزان بازماندگی و رشد افزایش می-یابد. ولی در سطح ۲۰۰ قسمت در هزار نتیجه منفی بوده است (۶). همچنین در یک بررسی مشابه در میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) پس از ۴۸ روز تغذیه نتیجه‌گیری شد سطح ۳g مانان الیگوساکارید در هر کیلوگرم جیره نتیجه بهتری را در رشد و بازماندگی در مقایسه با سایر تیمارها به دنبال دارد. در مطالعه‌ای استفاده همزمان پروبیوتیک باسیلوس *TC22* به میزان $۹^{۱۰}$ CFU و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید به میزان ۰/۰۵٪ جیره غذایی در ماهی *Apostichopus japonicus* باعث شد تا ضریب رشد ویژه دارای تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) با گروه شاهد باشد (۳۱).

سیستم کمپلمان یکی از مهم ترین فاکتورهای سرم به دلیل اثر فعال کنندگی آن بر دفاع سلولی محسوب می‌شود. میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان که مستقل از آنتی بادی می‌باشد، در ماهیان نسبت به پستانداران بیشتر است. پروتیئن‌های این سیستم نقش چند گانه‌ای را در دفاع علیه میکروارگانیسم‌ها به عهده دارند. لیزوزیم یکی دیگر از اجزاء اصلی سیستم دفاعی ایمنی بی مهرگان و مهره‌داران محسوب می‌شود.

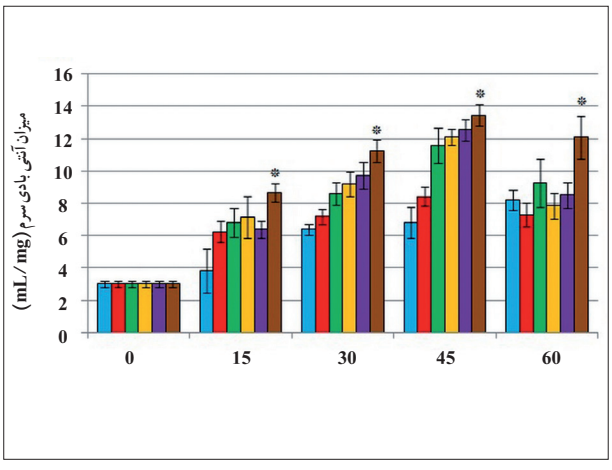


نمودار۱. میانگین میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. باکتوسل ۱۰۰mg و مانان ۵g باکتوسل۱۰۰mg و مانان ۲/۵g مانان ۵g مانان ۲/۵g باکتوسل۱۰۰mg شاهد



نمودار ۳. میانگین میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان سرم ماهیان تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. باکتوسل ۱۰۰mg و مانان ۵g باکتوسل۱۰۰mg و مانان ۲/۵g مانان ۵g مانان ۲/۵g باکتوسل۱۰۰mg شاهد

اگرچه نقش فیزیولوژی آن هنوز مشخص نیست، اما در دفاع علیه میکرو ارگانیسم‌های مهاجم شرکت می‌کند. میزان این آنزیم در سرم خون و موکوس پوست ماهیان به طور چشمگیری بالا می‌باشد. همچنین این آنزیم به دنبال تزریق فرآورده‌های میکروبی، در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و جیره غنی شده با پروبیوتیک در سرم ماهیان افزایش می‌یابد (۲۸). اختلال در سیستم ایمنی ماهیان به واسطه عوامل استرس‌زای محیطی، منجر به حساسیت بیشتر به انواع بیماریها می‌شود که توسعه اقتصادی آبزی پروری را محدود می‌نماید. استفاده از مکمل‌های غذایی که در افزایش رشد و بالا بردن سیستم ایمنی نقش دارند از جمله راه‌کارهایی می‌باشند که در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا می‌توانند مفید واقع شوند. همانگونه که از نتایج لیزوزیم پیداست، در تمام دوره‌های آزمایش تیمارهای ۴ و ۶ دارای بیشترین میانگین لیزوزیم به ترتیب ۲۷/۷۷µg/mL و ۲۸/۰۲ بوده و با سایر تیمارها



نمودار۲. میانگین میزان آنتی بادی تام سرم ماهیان تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. باکتوسل ۱۰۰mg و مانان ۵g باکتوسل۱۰۰mg و مانان ۲/۵g مانان ۵g مانان ۲/۵g باکتوسل۱۰۰mg شاهد

دارای اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵) می‌باشند. در روز ۴۵ تیمار ۶ دارای بیش‌ترین میانگین میزان لیزوزیم می‌باشد. می‌توان بالا بودن سطح میزان لیزوزیم سرم را در این تیمارها ناشی از بالا بودن مقدار پری بیوتیک مانان الیگوساکارید دانست. ولی در روز ۶۰ به دلیل قطع پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان، افت میانگین میزان لیزوزیم مشاهده می‌گردد و هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نمی‌شود. نتایج میزان کمپلمان نشان می‌دهد که در روز ۳۰ و ۴۵ تیمار ۶ دارای بیش‌ترین میزان کمپلمان سرم بوده است و در روز ۴۵ تیمارهای ۴ و ۵ نیز دارای بیش‌ترین میزان کمپلمان سرم هستند. نتایج میزان ایمونوگلبولین کل نشان می‌دهد که در روز ۳۰، ۴۵ و ۶۰ تیمار ۶ دارای اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵) با سایر گروه‌ها می‌باشد. بالا بودن میزان کمپلمان و ایمونوگلوبولین کل در تیمارهای ۵ و ۶ نسبت به سایر تیمارها به دلیل وجود پروبیوتیک باکتوسل می‌باشد که نقش آنتی‌ژن را ایفا می‌کنند. ولی در روز ۶۰ با قطع پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید میزان کمپلمان سرم و ایمونوگلوبولین کل در همه تیمارها کاهش می‌یابد. اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی (از جمله افزایش میزان لیزوزیم سرم) می‌شود (۱۹،۲۱). همچنین در قزل آلای تغذیه شده با گونه *Lactobacillus delbrucki* میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان و میزان لیزوزیم، ۲۰ روز پس از تغذیه باکتری، نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری (p<۰/۰۵) داشته است و به دنبال قطع باکتری مذکور در جیره غذایی میزان فعالیت سیستم کمپلمان کاهش یافته است. تحقیقات نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها با تحریک سیستم ایمنی ماهیان میزان بقاء را تا حد زیادی افزایش می‌دهند (۱). Torrecillas و همکاران در سال ۲۰۰۷ تأثیر سطوح مختلف مانان الیگوساکارید در جیره غذایی باس اروپایی (*Dicentrachus labrax*) را به میزان صفر، ۲g و ۴ مانان الیگوساکارید در

هر کیلوگرم جیره بررسی و گزارش نمودند در ماهیان تغذیه شده با سطح ۲ و ۴ گرم پری بیوتیک مذکور، میزان فعالیت لیزوزیم، مقاومت در برابر عفونت باکتریایی *Vibrio alginolyticus* و تحریک سیستم ایمنی به طور معنی داری افزایش یافت (۲۷). Cerezuela و همکاران در سال ۲۰۰۸ با افزودن اینولین به میزان ۵g یا ۱۰ در هر کیلوگرم جیره ماهی سیم دریایی (*Spaus aurata*) طی مدت یک تا دو هفته در شرایط پرورشی دریافتند که اینولین بازدارندگی معنی داری در شاخص های سیستم ایمنی به دنبال داشت و نتیجه گیری کردند که اینولین نمی تواند محرک ایمنی مناسبی برای این گونه باشد (۵). نتایج حاصل از آنالیز فاکتورهای ایمنی بیانگر تأثیر مثبت و تقویت اثر پروبیوتیک باکتوسل و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید در افزایش فعالیت میزان لیزوزیم، کمپلمان و ایمونوگلبولین کل می باشد که در نهایت ارتقاء سطح پاسخ ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان را به همراه دارد. در تحقیق حاضر پروبیوتیک و پری بیوتیک به کار رفته باعث بهبود شاخص های رشد و پاسخ سیستم ایمنی شدند که استفاده ترکیبی آنها و هر کدام به تنهایی نتایج مثبتی را به همراه داشته است. س

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که استفاده از ترکیبات طبیعی و ایمن به جای آنتی بیوتیک ها و محرک های رشد می تواند باعث افزایش رشد ماهی و ارتقاء سیستم ایمنی گردد و از ایجاد آلودگی های زیست محیطی نیز جلوگیری نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این بررسی مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت های مالی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه ابراز می دارند.

References

1. Amar, E.C., Kitron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T. (2000) Effect of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Sci. 66: 1068-1075.
2. Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L. (2005) Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquacult Res. 36: 758-767.
3. Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C., Ellis, A.E. (1999) *Vibrio anguillarum* resistance trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Fish Dis. 28: 693-710.
4. Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabraudan, J., Deschaux, P. (2001) Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte function: effect on gut and head kidney leucocyte. Fish Shelfish Immun. 11: 1-13.
5. Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, A. (2008) Effect of inulin on gilthead Seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish Shellfish Immunol. 24: 663-668.
6. Daniels, C. (2006) Bio-Mos® improves the growth and survival of cultured European Lobster. Fish Farm. 29: 24-27.
7. David, J.A., Jenkiss, C.W.C., Vladimir, V. (1999) Inulin, oligofructose and intestinal function. J Nutr. 129: 1431S-1433S.
8. Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K., Jani-Khalili, K. (2011) Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiol Biochem. 37: 833-842.
9. Flickinger, E.A., Van Loo, J., Fahey, G.C. (2003) Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. Clin Rev Food Sci Nutr. 43: 19-60.
10. Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.
11. Gatlin, D.M. (2002) Nutrition and fish health. In: Fish Nutrition. Halver, J.E., Hardy, R.W. (eds.). (1st ed.). Academic Press, San Diego, USA. p. 671-702.
12. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the colonic microbiota: introducting the concept of prebiotics. J Nutr. 125: 1401-1412.
13. Gomez-Gill, B., Herrera-Vega, M.A., Abreu-Grobois, F.A., Roque, A. (1998) Bioencapsulation of two different Vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl Environ Microbiol. 64: 18-22.
14. Hardy, R.W. (2002) Nutrient Requirement and Feeding of Fish for Aquaculture, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
15. Huang, S.S., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Schulte, P.M., Brauner, C.J. (2008) Effect of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and

ion regulatory development of spring Chinook salmon parr (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture. 274: 109-117.

16. Irianto, A., Austin, B. (2002) Probiotics in aquaculture. J Fish Dis. 25: 633-642.
17. Kim, D.H., Austin, B. (2006) Cytokine expression in Leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Infected by Probiotics. Vet Immun Immunopathol. 114: 297-304.
18. Kruger, N.J. (1996) The bradford method for protein quantitation. In: The Protein Protocols Handbook, Vol. 1. Walker, J.M. (ed.). Hummana Press, Totowa, NJ, USA. p. 11-15.
19. Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W., 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 Shellfish Immunol. 28: 8 37-844.
20. Merrifield, D., Bardley, G., Baker, R., Davies, S. (2009a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related heath criteria post antibiotic treatment. Aquacult Nutr. 16: 496-503.
21. Merrifield, D., Bardley, G., Baker, R., Davies, S. (2009b) 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). Aquacult Nutr. 17: 73-79.
22. Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., Aoki, T. (2007) Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) upon probiotic feeding. Fish Shellfish Immunol. 31: 372-382.
23. Rahmati Andani, H.R., Tukmechi, A., Meshkiniy, S., Ebrahimi, H. (1389) Enhancement of rainbow trout resistant against *Aeromonas hydrophyla* and *Yersinia ruckeri* with isolated Lactobacilli from Common carp intestine. Iran J Vet Med. 7: 26-35.
24. Ringo, E., Gatesoupe, F.J. (1998) Lactic Acid Bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160: 177-203.
25. Schley, P.D., Field, C.J. (2002) The immune-enhancing effects of dietary fibers and probiotics. Br J Nutr. 87: 221-230.
26. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G. L. (1994) Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet Immunol Immunopathol. 41: 125-139.
27. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izqueirdo, M.S. (2007) Immune stimulution and improved infection resistance in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immun. 23: 969-981.
28. Tukmechi, A., Morshedi, A., Delirezh, N. (2007) Changes in intestinal microflora and humoral immune response following probiotic administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Anim Vet Adv. 6: 1183-1189.
29. Waley, K., North, J. (1997) Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: Complement: A Practical Approach. Dodds, A.W., Sim, R.B. (eds). Vol. 1: Oxford University Press, Oxford, UK. p.19-47.
30. Xue, M., Luo, L., Wu, X., Ren, Z., Gao, P., Yu, Y., Pearl, G. (2006) Effect of sex alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolobrax japonicus*). Aquaculture. 260: 206-214.
31. Yancui, Z., Kangsen, M., Wei, X., Wenbing, Z. (2011) Influence of dietary probiotic bacillus TC22 and prebiotic fructooligosaccharide on growth, immune responses and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in sea cucumber *Apostichopus japonicas*. J Ocean Univ China. 3: 293-300.

Effects of bactocell probiotic and manan peribiotic on growth and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Jenabi Haghparast, R.[1], Meshkini, S.[2], Tukmechi, A.[3*]

[1]*Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia-Iran*

[2]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of veterinary Medicine, Urmia University, Urmia-Iran*

[3]*Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia-Iran*

(Received 7 March 2013 , Accepted 22 July 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Growth of population and food supply is one of the biggest problems in the world and aquaculture plays an important role in food production and supply for human beings. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the effect of commercial probiotic (Bactocell) and prebiotic (Manan) on the growth and immune parameters in rainbow trout. **METHODS:** Seven hundred and twenty fish were randomly divided into 6 groups with three replicates. The fish in the first group (control) were fed with commercial pelleted diet. The other five groups were fed with 100 mg of probiotic, 2.5 g (grams) of prebiotic, 5 g of prebiotic, 100 mg of probiotic and 2.5 g of prebiotic, and 100 mg of probiotic and 5 g of prebiotic per kilogram of food for 45 days, respectively. Then, all treatment groups were fed with usual food (without probiotic and prebiotic) for 15 days. Growth parameters were evaluated on days 0 and 60. Blood samples were collected for immunological experiments (level of Lysozyme, total antibody levels of serum, and activity of the complement system) on days 0, 15, 30, 45, and 60. **RESULTS:** All treatments fed with probiotic and peribiotic showed significant improvements ($p<0.05$) compared to the control group in terms of growth parameters including weight gain, special growth rate, and food conversion rate. The results of immunology also showed that fish fed with a combination of probiotic and peribiotic had a significant difference with other treatments and the control group ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** The use of Bactocell and Manan improved the growth and immune response of rainbow trout.

Key words: bactocell, growth parameters, immune parameters, manan, rainbow trout

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Biometric assays of fish fed with Bactocell and Manan for 60 days.

Graph 1. Serum lysozyme activity of all treatments at different time point. Bactocell 100 mg and manan 5 g ■ Bactocell 100 mg and manan 2/5 g ■ manan 5 g ■ manan 2/5 g ■ Bactocell 100 mg ■ Control ■

Graph 2. Serum total antibody level of all treatments at different time point. Bactocell 100 mg and manan 5 g ■ Bactocell 100 mg and manan 2/5 g ■ manan 5 g ■ manan 2/5 g ■ Bactocell 100 mg ■ Control ■

Graph 3. Serum complement alternative pathway activity of all treatments at different time points. Bactocell 100 mg and manan 5 g ■ Bactocell 100 mg and manan 2/5 g ■ manan 5 g ■ manan 2/5 g ■ Bactocell 100 mg ■ Control ■

***Corresponding author's email: a.tukmachi@urmia.ac.ir, Tel: 0441-3440295, Fax: 0441-3440295**