



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 3, 2020, pages: 69-81



Effects of kefir on growth performance, serum biochemistry, immune responses, histopathology and *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L. 1758)

Kowsar Asgari Savadjani¹, Maryam Mohammadi-Sichani^{1*}, Alireza Nazari²

1- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Isfahan, Iran

2- Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Isfahan, Iran

Received 14 May 2020

Accepted 17 September 2020

KEYWORDS

Cyprinus carpio

Kefir

Aeromonas hydrophila

Histology

Immunity

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial effects of kefir as a dietary supplement on the growth and infection caused by *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio*. Totally, 72 juvenile carp weighing approximately 10-15 g were used. The fish were divided into 4 groups fed with 3, 5 and 10% kefir and the control group (without adding kefir) with three replications (six fish per replication) and were fed 3% of their body weight daily. The antimicrobial effect of kefir against *A. hydrophila* was investigated as well. After two weeks, the levels of IgM, ALT, AST, ALP and total protein in fish serum were evaluated. The liver, kidney and spleen tissues of fish were examined for histological study. The results showed that the 48-h kefir product had the highest antimicrobial effect against *A. hydrophila*. Feeding the fish with 3% kefir caused significant increases in length and weight of the fish. The statistical analyses revealed that the levels of IgM, AST, ALP and the serum total protein were not significantly different between the four groups, while the average amount of ALT in treatment 3% exhibited significant difference, which was less than the other two groups, while was not significantly different from the control. All experimental groups exposed to *A. hydrophila* revealed tissue damage in liver, kidney and spleen. However, tissue damage was less in treatment 3%.

*Corresponding author: mohamadi_m@iaufala.ac.ir



"مقاله پژوهشی"

تأثیر کفیر بر شاخص‌های رشد، بیوشیمی سرم، پاسخ‌های ایمنی، آسیب‌شناسی بافتی و عفونت با آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L. 1758)

کوثر عسگری سوادجانی^۱، مریم محمدی سیجانی^{۱*}، علیرضا نظری^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، اصفهان

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۲۷

کلمات کلیدی

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی محصول کفیر به عنوان مکمل غذایی بر روی رشد و عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. تعداد ۷۲ قطعه بچه ماهی کپور (۱۵-۱۰ گرم) به ۴ گروه تغذیه شده با ۳، ۵ و ۱۰٪ کفیر و گروه شاهد (بدون افزودن کفیر) با سه تکرار (شش ماهی در هر تکرار) تقسیم، و روزانه به اندازه ۳٪ وزن بدنشان غذایی شدند. اثر ضد میکروبی محصول کفیر بر آئروموناس هیدروفیلا به روش انتشار چاهک، و تأثیرات دیگر آن بر روی ماهی‌های آلوده شده با آئروموناس هیدروفیلا بررسی شد. مقادیر ALP، AST، ALT، IgM و پروتئین کل در خون ماهی‌ها ارزیابی شد. همچنین از بافت کبد، کلیه و طحال ماهی‌ها برای بررسی‌های بافت‌شناسی نمونه‌برداری شد. نتایج نشان داد که محصول کفیر ۴۸ ساعته بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی آئروموناس هیدروفیلا را دارد. تغذیه ماهیان با ۳٪ کفیر باعث افزایش معنی‌دار درازا و وزن ماهی‌های مورد مطالعه شد. از نظر میزان AST، IgM، ALP و پروتئین کل سرمی ماهی‌ها، تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد، در حالی که میانگین مقدار ALT در تیمار ۳٪ کفیر به‌طور معنی‌دار کمتر از دو گروه دیگر بود. همه گروه‌های آزمایش در مواجهه با تیمار آئروموناس هیدروفیلا آسیب بافتی در کبد، کلیه و طحال نشان دادند. با وجود این، آسیب بافتی در تیمار ۳٪ کمتر از دیگر تیمارها بود.

مقدمه

پرورش آبزیان یکی از فعالیت‌های مهم اقتصادی در جهت تولید منابع پروتئینی در بسیاری از کشورهای جهان است. کمبود منابع آبی سبب شده است که اکثر کشورها پرورش انبوه و متراکم ماهی را جایگزین روش‌های نیمه‌متراکم و غیرمتراکم کنند. در تولید متراکم، ماهی‌ها در معرض شرایط استرس‌زا قرار می‌گیرند و این مسئله موجب ایجاد بیماری و متعاقب آن ضررهای اقتصادی می‌شود (Oddsson, 2020).

عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ماهی‌های پرورشی به شمار می‌روند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی روش معمول درمان این گونه عفونت‌ها در آبزیان است که باعث بروز سویه‌های مقاوم باکتریایی می‌شود. امروزه استفاده از ریزموجودات (میکروارگانسیم‌ها) مفید پروبیوتیکی در صنایع آبی پروری به منظور مدیریت بیماری‌ها به شکل روش‌های تغذیه‌ای، درمانی و حتی پیشگیری‌کننده بسیار جدی مطالعه شده است (Okocha et al. 2018, Pękala-Safińska, 2018). افزایش تولید آبزیان، مستلزم استفاده از خوراک با کیفیت و با میزان بالای پروتئین است. همچنین لازم است تا مکمل‌های غذایی مانند املاح، هورمون و آنتی‌بیوتیک نیز در جیره غذایی ماهی‌ها گنجانده شوند. در سال‌های اخیر به استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنایع آبی‌پروری به منظور مدیریت بیماری‌ها به شکل روش‌های درمانی و پیشگیری به شدت توجه شده است، به گونه‌ای که در بعضی از کشورهای دوست‌دار محیط‌زیست، مصرف پروبیوتیک‌ها در غذای ماهی - ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ارجحیت یافته است (Banerjee and Ray, 2017, Hoseinifar et al. 2018). همکاران (۲۰۱۶) مشخص کردند که هدف اصلی به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها، حذف آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش ایمنی و رشد ماهی‌های پرورشی و در نهایت، تولید ماهی سالم است. جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها قادر است مواد مغذی ضروری را تأمین کند، بلکه یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر استرس و عوامل بیماری‌زاست. Ganguly و همکاران (۲۰۱۳) اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها را در افزایش رشد، بهبود

ضریب تبدیل و سلامتی آبزیان به اثبات رساندند و اذعان داشتند که این ترکیبات را می‌توان در پرورش آبزیان به کار برد.

کفیر از جمله پروبیوتیک‌های مورد استفاده انسان است. کفیر نوعی شیر تخمیر شده توسط مجموعه‌ای از باکتری‌های مزوفیل و مخمرهاست. کفیر محصولی با ویسکوزیته (چسبندگی) بالا و همگن با pH حدود ۴/۳ تا ۴/۴ است (de Oliveira Leite et al. 2013).

Aeromonas hydrophila از عوامل بیماری‌زای شناخته شده و عفونت‌زای ماهی‌هاست که در بسیاری از گونه‌های مختلف ماهی‌های آب شیرین و شور بیماری ایجاد می‌کند. این باکتری با ترشح همولایزین باعث ایجاد عفونت خونی همراه با خونریزی (سپتیسمی هموراژیک)، پوسیدگی دم و باله‌ها، خونریزی در بافت‌های مختلف زیر شکم، اطراف مخرج و اطراف دهان ماهی می‌شود. همچنین، با ایجاد زخم‌هایی در پوست و باله دم ماهی همراه است. مطالعات نشان داده‌اند که کاهش استرس‌های معمول، کاهش بار مواد آلی آب و تقویت دستگاه ایمنی با پروبیوتیک‌ها، از عفونت ماهی‌ها با *Aeromonas hydrophila* پیشگیری می‌کند (Walczak et al. 2017, Pękala-Safińska, 2018).

تاکنون مطالعات بسیاری درباره اثر پروبیوتیک‌ها بر روی ماهی‌های مختلف انجام شده است. Gumus و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر تغذیه با جیره‌های حاوی کفیر بر عملکرد رشد و مشخصات اسیدهای چرب ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را بررسی کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که مصرف حداکثر ۱۰۰ گرم کفیر به ازای هر کیلوگرم غذا در رژیم غذایی، باعث بهبود مشخصات اسیدهای چرب در گوشت ماهی، بدون اثر سوء بر رشد و میزان زنده ماندن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. Can و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که ۴۰ گرم کفیر به ازای هر کیلوگرم ماده غذایی ماهی قزل‌آلا (*Salmo coruhensis*) پس از ۳ ماه مصرف، نقش ضد اکسایشی دارد و نتیجه‌گیری کردند که تأثیر کفیر به دوز و زمان مصرف در ماهی بستگی دارد. Choi و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر کفیر را به عنوان یک افزودنی خوراکی با ویژگی پروبیوتیکی بر ایمنی ذاتی و بقای میگوی

غذای ماهی همراه محصول کفیر ۴۸ ساعته استفاده شد. تیمارها شامل گروه شاهد (بدون افزودن کفیر)، ۳، ۵ و ۱۰٪ کفیر بود و ماهی‌ها به مدت دو ماه تغذیه شدند (Prado et al. 2015).

برای شناسایی ریزموجودات غالب در محصول کفیر، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} تهیه، و بر روی محیط‌های آگار مغذی و لوریا برتونی کشت داده شد. از پرگنه‌های خالص لام رنگ-آمیزی گرم تهیه، و شناسایی مولکولی نمونه‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) با آغازگرهای 27F و 1492R، برای تعیین توالی ژن 16S rRNA انجام شد (Zorriehzaha et al. 2020).

بررسی اثر ضد میکروبی کفیر بر آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی اثر ضد میکروبی محصول کفیر بر آئروموناس هیدروفیلا (ATCC:7965) (انستیتو پاستور، تهران) از روش انتشار چاهک استفاده شد. از کشت تازه ۲۴ ساعته آئروموناس هیدروفیلا کدورتی معادل نیم مک‌فارلند (معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شد. سوسپانسیون باکتری به روش کشت یکنواخت بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بر روی محیط کشت چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. در هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصول کفیر ریخته شد. همه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن، قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک اندازه‌گیری و ثبت شد. آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (Balouiri et al. 2016).

آزمایش مواجهه‌سازی با آئروموناس هیدروفیلا

برای آزمایش مواجهه‌سازی ماهی‌ها با آئروموناس هیدروفیلا، پس از طی دوره تغذیه ۲ ماهه، در ۳ گروه ۶ تایی و گروه شاهد، باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا، به میزان $10^6 \times 1/5$ (LD50) میلی‌لیتر و با دوز $10^6 \times 1/5$ به زیر باله شکمی ماهی‌ها تزریق شد. ماهی‌های آلوده شده به مدت ۲ هفته از نظر تلفات و ضایعات خونریزی‌دهنده روی جلد پایش شدند و

پا سفید (*Litopenaeus vannamei*) در برابر بیماری ویروسی لکه سفید بررسی کردند. آزمایش‌های آن‌ها نشان داد که مصرف کفیر همراه با غذای میگو، نه تنها در پیشگیری از بیماری لکه سفید مؤثر است، بلکه وزن میگوی تغذیه شده با کفیر نسبت به گروه کنترل ۱۲۰٪ و همچنین، طول آن‌ها افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که کفیر را می‌توان به عنوان یک افزودنی خوراکی کاربردی برای بهبود ایمنی ذاتی و بهره‌وری میگوی پا سفید در پرورش میگو، بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک به کار برد. به نظر می‌رسد که نکات زیادی در افزایش کارایی پرورش آبزیان با استفاده از پروبیوتیک‌ها وجود داشته باشد. استفاده از پروبیوتیک‌هایی مانند کفیر برای مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا با حذف رقابتی، شیوه‌ای قابل قبول در پرورش ماهی به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدباکتریایی محصول کفیر به عنوان مکمل غذایی بر روی رشد کپور معمولی و بیماری ناشی از آئروموناس هیدروفیلاست.

مواد و روش‌ها

تغذیه، نگهداری و زیست‌سنجی ماهی‌ها

تعداد ۷۲ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با وزن تقریبی ۱۵-۱۰ گرم از مزرعه پرورش ماهی تهیه شد. ابتدا ماهی‌ها با محلول ۳٪ آب نمک به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس به مخازن ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی مجهز به پمپ هوادهی انتقال یافتند. ماهی‌ها به مدت ۲ هفته برای رفع حالت استرس و تطابق با محیط در شرایط استاندارد از نظر آب، دما و غذا قرار گرفتند. در طی دوره مطالعه دمای آب مخازن $25 \pm 2^\circ\text{C}$ تنظیم شد. پس از اتمام این دوره ماهی‌ها به طور کاملاً تصادفی در ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری تقسیم شدند. برای تغذیه ماهی‌ها از یک نمونه غذای تجاری با ترکیب ۴۱٪ پروتئین، ۶٪ چربی و ۵٪ فیبر استفاده شد. ماهی‌ها روزانه به اندازه ۳٪ وزنشان در دو نوبت صبح و بعدازظهر غذادهی شدند (Wang et al. 2015).

محصول کفیر با افزودن ۶۰ گرم دانه کفیر به ظرف حاوی ۱ لیتر شیر جوشیده خنک شده تهیه شد. این ظرف در محیط تاریک و در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و محصول کفیر ۴۸ ساعته آماده شد. برای تغذیه ماهی‌ها از

Zargari et al. 2018,) میکروسکوپ مطالعه شدند (Ragasa et al. 2019).

شاخص‌های رشد و تغذیه

شاخص‌های رشد ماهی‌ها شامل درازا و وزن آن‌ها در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ سنجش شدند. شاخص‌های دیگر، مانند ضریب رشد ویژه (SGR^1)، ضریب تبدیل غذایی (FCR^2) و درصد بازماندگی (SR^3) در گروه‌های مورد آزمایش با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$\text{ضریب رشد ویژه} = \frac{\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}}{\text{تعداد روزهای غذایی}} \times 100$$

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد ماهی‌ها اولیه}}{\text{تعداد ماهی‌ها بازمانده در پایان}} \times 100$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \frac{\text{غذای دریافت شده (گرم)}}{\text{کل وزن (گرم)}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل‌های آماری

برای مقایسه وزن، طول و شاخص‌های خونی ماهی‌های کپور بین چهار گروه و همچنین، طی شش مرحله اندازه‌گیری، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. در صورت همگنی واریانس از آزمون تعقیبی دانکن و در غیر این صورت از آزمون تعقیبی دانن برای انجام مقایسه‌های دوتایی استفاده شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمون انتشار چاهک نشان داد که محصول کفیر ۴۸ ساعته با میانگین قطر هاله عدم رشد $2/6 \pm 14/4$ میلی‌متر دارای اثر ضد میکروبی مناسبی بر باکتری ائروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی بود. قطر هاله عدم رشد جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$) $2/1 \pm 20/2$ به دست آمد (شکل ۱).

³ Survival rate

¹ Specific growth rate

² Food conversion ratio

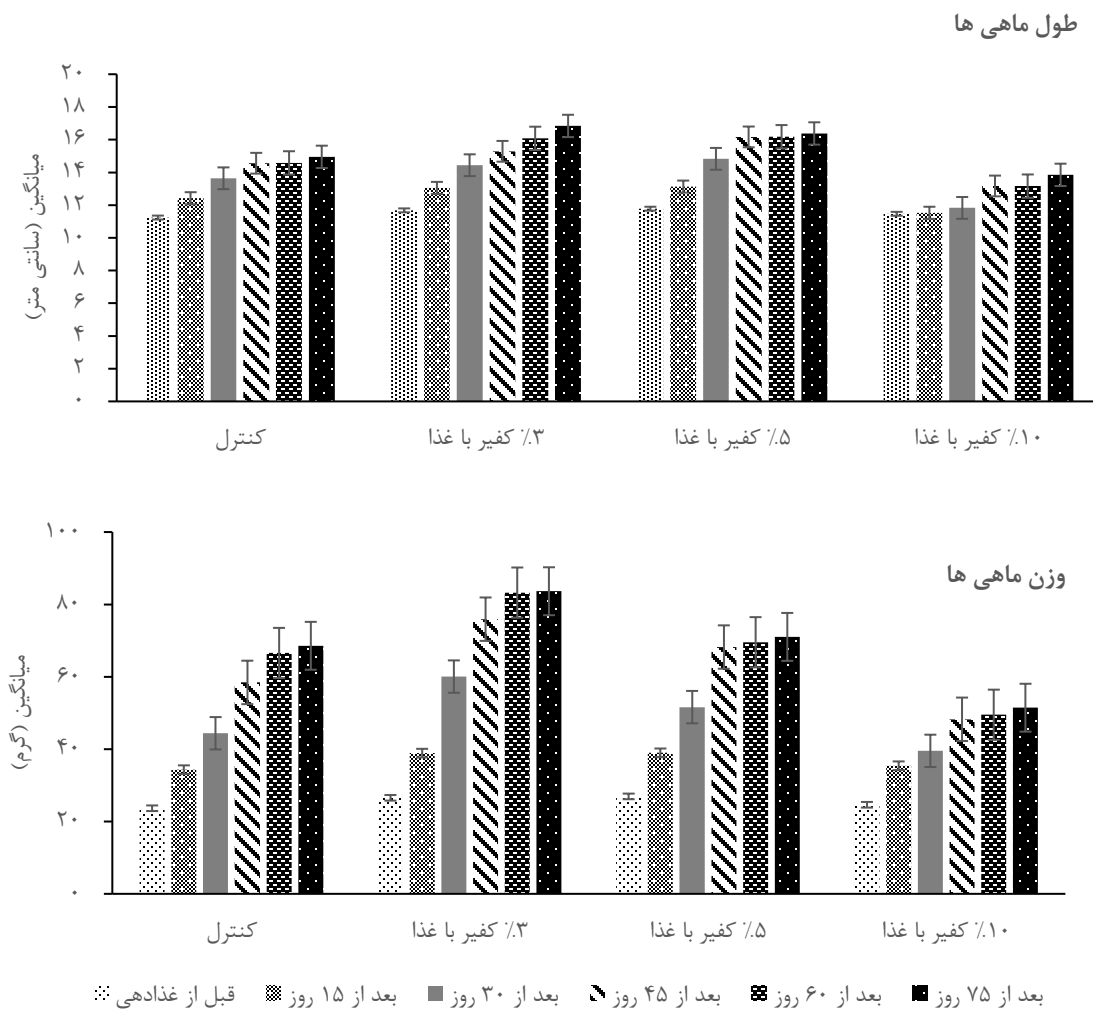


شکل ۱ هاله عدم رشد آئروموناس هیدروفیلا در حضور محصول کفیر ۴۸ ساعته و جنتامایسین.

نتایج زیست‌سنجی ماهی‌ها پس از تغذیه با محصول کفیر

نتایج مقایسه میزان افزایش درازا و وزن ماهی‌های تغذیه شده با غذای معمولی و نمونه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف محصول کفیر همراه با غذا در شکل ۲ نشان داده شده است.

مقایسه توالی‌یابی rRNA ۱۶S باکتری میله‌ای شکل (باسیلوس) گرم مثبت جداسازی شده از محصول کفیر با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم-افزار BLAST انجام شد و براساس جستجوی توالی‌های مشابه در پایگاه NCBI سویه باسیلوس مورد بررسی با سویه-های *Lactobacillus plantarum* ثبت شده در این مرجع تشابه ۹۹/۷۷٪ نشان داد. سویه شناسایی شده با شماره دسترسی MZ295223 در بانک ژن ثبت شد.



شکل ۲ مقایسه میانگین درازا و وزن ماهی‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف کفیر بین چهار گروه آزمایشی.

شاهد با تیمارهای ۱۰ و ۵٪ کفیر تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$).

طبق نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، در شروع غذادهی تفاوت معنی‌داری بین درازای ماهی‌های چهار گروه مشاهده نشد ($p > 0.05$)، ولی در روزهای ۱۵ تا ۷۵ اختلاف معنی‌داری بین میانگین درازای این گروه‌ها وجود داشت ($p < 0.05$). در ۷۵ روز پس از غذادهی، میانگین درازای ماهی‌ها در تیمار ۵٪ کفیر در مقایسه با تیمار ۳٪ تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$)، ولی در این دو گروه نسبت به دو گروه شاهد و ۱۰٪ کفیر به‌طور معنی‌دار بیشتر بود ($p < 0.05$). میانگین

بر اساس شکل ۲ و نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، در تیمارهای ۵ و ۳٪ کفیر تفاوت معنی‌داری بین وزن ماهی‌ها طی شش نوبت اندازه‌گیری مشاهده شد ($p < 0.05$). طبق نتایج آزمون واریانس یک‌طرفه، در شروع غذادهی و ۱۵ روز بعد از آن، تفاوت معنی‌داری بین وزن ماهی‌های چهار گروه مشاهده نشد ($p > 0.05$)، ولی در روزهای ۳۰ تا ۷۵ اختلاف معنی‌داری بین میانگین وزن این گروه‌ها وجود داشت ($p < 0.05$). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی دانت، در ۶۰ و ۷۵ روز بعد از شروع غذادهی، میانگین وزن ماهی‌ها در تیمار ۳٪ کفیر به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد و تیمارهای ۱۰ و ۵٪ کفیر بود ($p < 0.05$). میانگین وزن ماهی‌ها در گروه

درازای ماهی‌ها در گروه شاهد نسبت به تیمار ۳٪ کفیر به‌طور معنی‌دار کمتر بود ($p < 0.05$). نتایج حاصل از بررسی اثر محصول کفیر بر شاخص‌های رشد ماهی‌ها، پس از دو ماه آزمایش، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ شاخص‌های رشد ماهی‌های کپور معمولی پس از دو ماه تغذیه با مقادیر مختلف کفیر بین چهار گروه آزمایشی.

شاخص‌ها	گروه شاهد	تیمار ۳٪	تیمار ۵٪	تیمار ۱۰٪
ضریب رشد ویژه	0.07 ± 0.02^a	0.07 ± 0.01^a	0.08 ± 0.01^a	0.04 ± 0.03^b
بازماندگی (/.)	100 ± 0^a	94.4 ± 3.5^a	80 ± 1.7^b	83.4 ± 4.2^b
ضریب تبدیل غذایی	0.05 ± 0.02^b	0.06 ± 0.07^a	0.04 ± 0.06^c	0.04 ± 0.05^c

*حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

فراسنجه‌های سرمی ماهی آلوده شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا

میزان IgM با افزایش درصد کفیر در غذای ماهی‌های گروه-های مختلف، افزایش نشان داد. با وجود این، افزایش مذکور اختلاف معنی‌دار آماری نشان نداد ($p > 0.05$). همچنین، تغییرات مشاهده شده در میزان آنزیم‌های کبدی AST، ALP و پروتئین کل سرمی در تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). مقادیر آنزیم ALT در تیمارهای ۵ و ۱۰٪ در مقایسه با گروه شاهد و تیمار ۳٪ اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۲).

جدول ۱ مقایسه میانگین شاخص‌های رشد در گروه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف کفیر را نشان می‌دهد. همین‌طور که مشاهده می‌شود، میزان ضریب رشد ویژه در تیمار ۱۰٪ کفیر اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۳ و ۵٪ و گروه شاهد دارد که نشان‌دهنده نقش کفیر در افزایش وزن ماهی-هاست ($p < 0.05$). درصد بازماندگی که معیاری از تعداد ماهی‌های زنده پس از طی دوره رشد است، نیز نشان می‌دهد که بقای ماهی‌های تیمار ۳٪ کفیر و شاهد نسبت به گروه‌هایی که مقادیر بیشتری کفیر دریافت کردند، بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($p < 0.05$). نتایج ضریب تبدیل غذایی نیز اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها و شاهد نشان داد ($p < 0.05$) که در این بین بیشترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳٪ مشاهده شد.

جدول ۲ مقادیر فراسنجه‌های خونی (میانگین \pm انحراف معیار) ماهی‌های کپور تغذیه شده با مقادیر مختلف کفیر.

گروه	IgM (mg/dL)	AST (mg/dL)	ALT (mg/dL)	ALP (mg/dL)	پروتئین کل (mg/dL)
شاهد	26.0 ± 1.4	269.5 ± 14.7	7.4 ± 0.5^a	45.7 ± 4.2	3.8 ± 0.6
تیمار ۳٪	31.1 ± 1.02	254.6 ± 10.9	6.9 ± 0.6^a	68.7 ± 5.8	4.8 ± 1.2
تیمار ۵٪	31.6 ± 1.4	276.3 ± 27.9	15.1 ± 1.5^b	86.7 ± 6.2	4.1 ± 0.7
تیمار ۱۰٪	42.8 ± 1.6	242.9 ± 16.9	11.8 ± 2.2^b	92.9 ± 5.3	4.7 ± 1.2

*حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

های رماک (باخته‌های کبدی قرمز رنگ) تا اندازه‌ای حدود چند وجهی خود را از دست دادند. هسته‌ها هیپرکروم شده و سینوزوئیدها تا حدودی شکل و ظاهر طبیعی خود را از دست دادند. در لام بافتی کبد تیمارهای ۳، ۵ و ۱۰٪ کفیر نیز به-

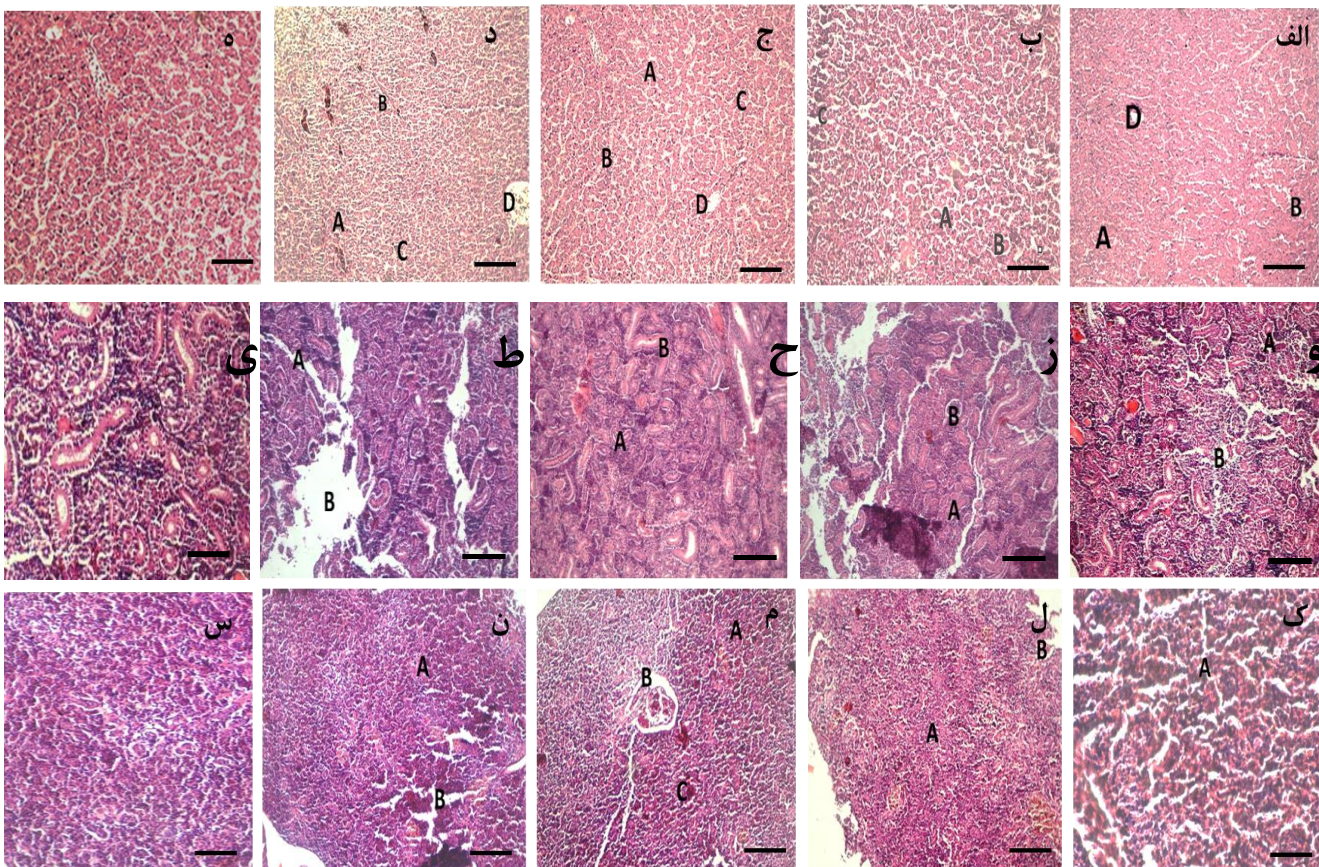
نتایج حاصل از بررسی بافتی کبد کپور ماهی‌های آلوده شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا که غذای معمولی دریافت کردند مشخص کرد که سیاهرگ‌های مرکزی تا حدی پر خون شده‌اند که گویای تغییر آسیب شناسی محدود است. طناب-

کلیه تیمارهای ۳ و ۵٪، تبول‌های کلیوی استحاح (دژنره شده)، بافت خون‌ساز به‌هم‌ریخته و فضای ادراری کاهش یافته مشاهده شد.

یاخته‌های طحال کپور ماهی‌های آلوده شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که پولپ‌های قرمز و سفید تا حد زیادی تخریب شده‌اند. فولیکول‌های لنفاوی حدود خود را از دست داده‌اند. گلبول‌های قرمز کمتر شده ولی در عوض تعداد لنفوسیت‌ها افزایش یافته است. وضعیت به‌هم‌ریختگی بافت طحال در همه گروه‌های تغذیه شده با کفیر که در معرض آئروموناس هیدروفیلا قرار گرفتند، هم مشاهده شد (شکل ۳).

هم‌ریختگی یاخته‌ها، افزایش رنگدانه‌های ملانین مشاهده شد. تغییرات آسیب‌شناسی و پرخونی در تیمار ۳ و ۵٪ کفیر بیش از ۱۰٪ بود.

همچنین، بررسی بافت کلیه کپور ماهی‌های آلوده شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا که غذای معمولی دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد، تخریب کامل بافت و تغییرات آسیب‌شناسی بسیار مشهودی را نشان داد. لوله‌های (توبول‌های) نفرون کاملاً از بین رفتند؛ یاخته‌های پوشاننده نفرون‌ها نیز تا حد زیاد شکل طبیعی خود را از دست دادند که دلالت بر تأثیرپذیری عامل بیماری‌زا روی این بافت‌ها دارد. در بررسی بافت کلیه تیمار ۱۰٪، ساختار لوله‌ای منظم و بافت خون‌ساز (هماتوپویتیک) یکنواخت مشاهده شد، در حالی که در بافت



شکل ۳ تصاویر مقاطع بافتی تیمارهای ۳، ۵ و ۱۰٪ کفیر، گروه ماهی‌های بیمار و گروه شاهد. الف) بافت کبد تیمار ۳٪ کفیر (A) طناب رماک (B) سینوزوئید (C) سیاهرگ مرکزی، (ب) بافت کبد تیمار ۵٪ کفیر. (A) یاخته کبدی، (B) طناب رماک، (C) سینوزوئید. (ج) برش بافتی کبد تیمار ۱۰٪ (A) سیاهرگ مرکزی، (B) سینوزوئید، (C) یاخته کبدی، (D) طناب رماک. (د) برش بافت کبد ماهی‌های گروه آلوده شده با باکتری و دریافت‌کننده غذای معمولی (A) یاخته کبدی، (B) سیاهرگ مرکزی، (C) سینوزوئید، (D) طناب‌های

رماک. ه) برش بافت کبد ماهی‌های سالم. و) بافت کلیه تیمار ۳٪ A) توبول‌ها، B) تغییرات آسیب شناختی توبول‌ها. ز) بافت کلیه تیمار ۵٪ A) توبول‌ها، B) جسمک کلیوی. ح) بافت کلیه تیمار ۱۰٪ کفیر A) شبکه گلومرول، B) کپسول بومن. ط) برش بافت کلیه ماهی‌های گروه آلوده شده با باکتری و دریافت‌کننده غذای معمولی A) از بین رفتن توبول‌های نفرون B) تخریب بافتی. ی) برش بافتی کلیه ماهی‌های سالم. ک) بافت طحال تیمار ۳٪ A) هسته هیپرکروم. ل) بافت طحال تیمار ۵٪ A) پولپ قرمز، B) پولپ سفید. م) بافت طحال تیمار ۱۰٪ A) پولپ قرمز، B) پولپ سفید. ن) برش بافتی طحال کپور ماهی‌های آلوده شده با باکتری و تغذیه‌شده با غذای معمولی A) پولپ قرمز، B) پولپ سفید. س) برش بافتی طحال ماهی‌های سالم (scale bar=۱۰۰ میکرومتر).

بحث

دستگاه ایمنی ماهی با مصرف محصول کفیر فعال شده است، اگرچه این میزان افزایش از نظر آزمون‌های آماری معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج تحقیق Van Doan و همکاران (۲۰۱۷) که تأثیر کفیر بر دستگاه ایمنی غیراختصاصی ماهی تیلاپیا را بررسی کردند، مطابقت دارد. این محققان با به‌کارگیری ۴۰ گرم کفیر به ازای هر کیلوگرم غذا در ماهی‌هایی با وزن ۱۸ گرم به مدت ۵۰ روز توانستند تأثیر مثبت کفیر بر روی دستگاه ایمنی ماهی تیلاپیا در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی را نشان دهند. Uluköy و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر کفیر بر روی پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها در ماهی قزل‌آلا را با به‌کارگیری جیره حاوی ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ گرم کفیر به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۳۵ روز بر روی ماهی‌هایی با وزن متوسط ۵۶ گرم بررسی کردند.

آنچه که از نتایج حاصل از این تحقیق در مقایسه با دیگر تحقیقات انجام شده در خصوص کاربرد کفیر حاصل شده، مبین آن است که مقدار و مدت زمان مصرف کفیر ارتباط مستقیمی با شدت تأثیرگذاری کفیر بر روی وضعیت ایمنی ماهی‌ها دارد. در این تحقیق، پس از تغذیه ماهی‌ها با غذای حاوی ۳، ۵ و ۱۰٪ کفیر به مدت ۲ ماه، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته در معرض باکتری آئروموناس هیدروفیلا گرفتند. نتایج حاصل از مقاطع بافتی کبد، کلیه، و طحال، آسیب‌های بافتی در همه گروه‌ها را نشان داد. مشاهده آسیب‌های بافتی در گروه شاهد بیانگر فعال بودن باکتری آئروموناس به‌کار گرفته شده در آزمایش بود.

Alishahi و همکاران (۲۰۱۸)، تأثیر باکتری‌های پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *L. bulgaricus* را بر شاخص‌های رشد و باکتری‌های مولد اسید لاکتیک روده‌ای در ماهی کپور معمولی بررسی کردند. نتایج حاصل از این

کاربرد پروبیوتیک‌ها در صنعت آبی‌پروری سابقه چندین ساله دارد. از مهمترین کاربردهای پروبیوتیک‌ها، تأثیرگذاری آن‌ها بر شاخص‌های رشد و بازماندگی و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌هاست. در تحقیق حاضر، علاوه بر بررسی تأثیر کفیر به عنوان یک پروبیوتیک بر روی رشد و بازماندگی ماهی کپور، تأثیر آن در افزایش قدرت ایمنی ماهی در برابر باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا بررسی شد.

نتایج افزایش وزن و درازای ماهی‌ها نشان داد که غذای همراه با ۳٪ کفیر در رشد ماهی‌ها مؤثر بوده است. Ariman و Karabulut و همکاران (۲۰۱۸) غلظت صفر، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم کفیر در هر کیلوگرم غذا را به مدت ۹۰ روز بر روی ماهی‌هایی با وزن ۲۴ گرم بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که استفاده از کفیر به میزان ۲۰ میلی‌گرم روزانه توانسته است بر روی رشد ماهی‌ها تأثیرگذار باشد. میزان مصرف کفیر و وزن ماهی‌های مورد آزمایش در پژوهش حاضر برابر با مقادیر استفاده شده در تحقیق Can و همکاران (۲۰۱۲) بوده است. این محققان تأثیر کفیر در ماهی قزل‌آلای چوروه (*Salmo coruhensis*) را با مقادیر صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ گرم کفیر در هر کیلوگرم غذای ماهی به مدت ۶۰ تا ۹۰ روز بر روی ماهی‌هایی با وزن حدود ۱۰ گرم بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داد که تأثیر کفیر بستگی به میزان مصرف و مدت زمان مصرف دارد و همچنین، خاصیت ضدآکسایشی آن را نیز اثبات کردند. در این تحقیق نیز اثر مناسب کفیر در افزایش وزن و درازای ماهی‌ها مشاهده شد.

افزایش میزان Igm و مجموع پروتئین کل سرم به عنوان یکی از شاخص‌های وضعیت دستگاه ایمنی ماهی بررسی می‌شود. افزایش میزان Igm در سرم ماهی‌های تغذیه شده با کفیر در گروه‌های مختلف آزمایش، نشان‌دهنده این است که

به داخل جریان خون نشت می‌کنند. بنابراین، افزایش این آنزیم‌ها در اثر مصرف ۵٪ کفیر، نشانه اختلال عملکرد کبد است که با نتایج بافت‌شناسی کبد در این مطالعه مطابقت دارد و با توجه به نمونه شاهد، ممکن است ریزموجودات پروبیوتیکی موجود در کفیر هم در این افزایش نقش داشته باشند.

بافت کبد، کلیه و طحال ماهی‌های مبتلا به آئروموناس هیدروفیلا هم توسط برخی از محققان بررسی شده است. Ahmadi (۲۰۱۱) و Ghelichpour (۲۰۱۷) گزارش کردند که بافت کبد ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به آئروموناس هیدروفیلا، آسیب‌های یاخته‌ای مانند تورم یاخته‌های کبدی، کاهش قدرت رنگ‌پذیری و افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژها را نشان می‌دهد. همچنین، در بررسی بافت کلیه این ماهی‌های آلوده، تورم یاخته‌های پوششی در لوله‌های کلیوی و هایپرتروفی (تزايد) یاخته‌ها دیده شد. این امر باعث شد که یاخته‌ها به‌وضوح قابل تشخیص نباشند و فضای داخلی لوله کلیه کاهش یابد. در بافت طحال ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده، افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژها و تجمع رنگدانه‌های هموسیدرین مشاهده شد. آن‌ها اعلام کردند که نکرروز پارانشیم کبدی و آسیب‌های مشاهده شده در بافت کلیه و طحال ماهی‌ها ممکن است ناشی از خصوصیات سمی آندوتوکسین‌های باکتری آئروموناس هیدروفیلا باشد که با نتایج تحقیق حاضر همسو است.

با توجه به تأثیر متفاوتی که مصرف کفیر همراه با غذای ماهی بر روی شاخص‌های رشد، پاسخ‌های ایمنی، بیوشیمی سرم و آسیب‌شناسی بافتی ماهی کپور نشان داد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف ۳٪ کفیر به عنوان پروبیوتیک همراه با غذای ماهی می‌تواند اثرات سودمندی در پرورش ماهی کپور داشته باشد. با وجود این، لازم است تا برای دستیابی به فرموله کردن مناسب آن برای ماهی‌ها در سنین مختلف رشد، شرایط متفاوت پرورش ماهی و نوع ماهی‌ها، آزمایش‌های تکمیلی انجام شود.

پژوهش نشان داد که لاکتوباسیلوس‌ها باعث افزایش شاخص‌های رشد و افزایش نسبت باکتری‌های مولد اسید لاکتیک در روده ماهی‌ها می‌شود. همچنین، آن‌ها بیان کردند که به شرط انجام آزمایش‌های تکمیلی، این باکتری می‌تواند گزینه مناسبی برای اضافه کردن به غذای کپور ماهی‌های پرورشی باشد (Alishahi et al. 2018). Kazuń و Kazuń (۲۰۱۹) استفاده از پروبیوتیک‌ها را در پرورش نوزاد ماهی‌ها بررسی و گزارش کردند که می‌توان از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان محرک و بهبوددهنده رشد ماهی‌ها استفاده کرد. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که اضافه کردن پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بقای نوزاد ماهی‌ها، کنترل بیماری‌های آبزیان و بهبود شرایط ماهی‌های پرورشی می‌شود. جوانمردی و همکاران (۲۰۱۹) برای بهبود رشد و سطح ایمنی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا، از جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* استفاده کردند. آن‌ها توصیه کردند که استفاده از ۲ تا ۳ گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در هر کیلوگرم جیره ماهی تیلاپیای نیل می‌تواند عملکرد رشد و ایمنی آن را به شکل قابل توجهی افزایش دهد (جوانمردی و همکاران، ۱۳۹۸). آنچه که از مجموع مطالعات برداشت می‌شود این است که وجود لاکتوباسیلوس‌ها با ویژگی پروبیوتیکی در رژیم غذایی ماهی اثرات مفیدی در رشد آن‌ها خواهد داشت.

آنزیمی‌های کبد AST و ALT نقش بسیار مهمی در خنثی‌سازی عوامل سمی و نیز فعالیت‌های سوخت‌وسازی کبد دارند. آمینوترانسفرازها شاخصی برای سلامت یاخته‌های کبدی به‌شمار می‌روند و در مراحل اولیه تخریب کبد، نفوذپذیری غشاء افزایش می‌یابد. مطالعات نشان داده‌اند که عفونت‌های باکتریایی، باعث افزایش میزان این آنزیم‌ها در ماهی‌ها می‌شوند. با توجه به افزایش آنزیم AST در ماهی‌های واجد عفونت، به‌نظر می‌رسد که بدون در نظر گرفتن نوع عامل باکتریایی که در ماهی ایجاد بیماری کرده است، این عامل قادر به ایجاد آسیب کبدی در ماهی‌هاست. در نتیجه، آنزیم‌های سیتوپلاسمی یاخته‌های کبدی از یاخته‌ها

منابع

هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*). محیط زیست جانوری ۱۱: ۱۶۲-۱۵۵.

Ahmadi, K., Mirvaghefi, A., Banaee, M., Mousavi, M. 2011. Histopathology and Hematology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 64: 217-227.

Alishahi, M., Tulaby Dezfuly, Z., Mesbah, M., Mohammadian, T. 2018. Effects of two probiotics, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus* on growth performance and intestinal lactic acid bacteria of *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine 12: 207-217.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6: 71-79.

Banerjee, G., Ray, A.K. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Research in Veterinary Science 115: 66-77.

Can, E., Kurtoğlu, İ., Benzer, F., Erişir, M., Kocabaş, M., Kızak, V., Kayım, M., Çelik, H. 2012. The effects of different dosage of kefir with different durations on growth performances and antioxidant system in the blood and liver tissues of Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 12: 277-283.

Choi, W., Choi, C.W., Son, D.B., Jeong, B.C., Kim, H.C., Lee, H., Suh, J.W. 2020. Effects of fermented kefir as a functional feed additive in *Litopenaeus vannamei* farming. Fermentation 6: 1-10.

De Oliveira Leite, A.M., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. 2013.

جوانمردی، رضایی توابع، ک.، مرادی، س.، بیات غیائی، ل. ۱۳۹۸. اثرات تغذیه ای پروبوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) بر عملکرد رشد، فعالیت

آنزیم های هضمی و میزان مقاومت در برابر آئروموناس

Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. Brazilian Journal of Microbiology 44: 341-349.

Ghelichpour, M., Taheri Mirghaed, A., Mirzargar, S.S., Joshaghani, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H. 2017. Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* exposed to an oxadiazin pesticide, indoxacarb. Aquaculture Research 48: 5666-5676.

Gümüş, E., Kubilay, A., Guney, S., Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Metin, T., Ulukoy, G. 2017. Effect of dietary kefir on the growth performance, feed utilization and fatty acid profile of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Nutrition 23: 964-972.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A., Zhou, Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of Current knowledge and future perspectives. Frontiers in Microbiology 9: 2429-2429.

Oddsson, G. 2020. A definition of aquaculture intensity based on production functions-the aquaculture production intensity scale (APIS). Water 12: 1-14.

Okocha, R.C., Olatoye, I.O., Adedeji, O.B. 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. Public Health Reviews 39: 21-21.

Pełkala-Safińska, A. 2018. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. Journal of Veterinary Research 62: 261-267.

Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., Castro, G., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures,

- biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* 6: 1177-1177.
- Ragasa, L., Dinglasan, J., Felipe, I., Basiao, Z., Velarde, M. 2019. Exposure to *Aeromonas hydrophila* induces inflammation and increases expression of the gene encoding for a putative dual CTLD-containing lectin in milkfish liver. *Comparative Biochemical and Molecular Biology* 230: 37-47.
- Uluköy, G., Metin, S., Kubilay, A., Güney, S., Yıldırım, P., Güzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., E. 2017. The effect of kefir as a dietary supplement on nonspecific immune response and disease resistance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society* 48: 248-256.
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Tapingkae, W., Khamtavee, P. 2017. The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 62: 139-146.
- Walczak, N., Puk, K., Guz, L. 2017. Bacterial Flora associated with diseased freshwater ornamental fish. *Journal of Veterinary Research* 61: 445-449.
- Wang, J.L., Meng, X.l., Lu, R.h., Wu, C., Luo, Y.T., Yan, X., Li, X.J., Kong, X.H., Nie, G.X. 2015. Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 435: 293-300.
- Zargari, A., Mazandarani, M., Hoseini, S. 2018. Effects of safflower (*Carthamus tinctorius*) extract on serum antibacterial activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and *Yersinia ruckeri*. *International Journal of Aquatic Biology* 6: 1-7.
- Zorriehzahra, M.J., Yazdanpanah-Goharrizi, L., Rokhbakhsh-Zamin, F., Kazemipour, N., Kheirkhah, B. 2020. Isolation, biochemical and molecular detection of *Aeromonas hydrophila* from cultured *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 19: 2422-2436.