

اثر واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*) و ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*) بر آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*)

چکیده

مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه بر علیه استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بچه ماهیان دریایی آسیایی ($20/0 \pm 35/37$) در پاییز ۱۳۹۸ انجام گرفت. ماهیان به‌صورت تصادفی به ۷ گروه آزمایشی تقسیم شدند گروه اول شامل تزریق سرم فیزیولوژی، گروه دوم شامل واکسن استرپتوکوکوس اینیه به روش تزریقی، گروه سوم شامل استرپتوکوکوس اینیه به روش غوطه‌وری، گروه چهارم شامل ماهیان تزریق‌شده با واکسن ویبریو هاروی به روش تزریقی، گروه پنجم ماهیان تزریق‌شده با ویبریو هاروی به روش غوطه‌وری، گروه ششم واکسن دوگانه استرپ-ویبریو به روش غوطه‌وری گروه هفتم شامل ماهیان واکسینه شده با واکسن دوگانه استرپ-ویبریو به روش تزریقی بودند. تمامی گروه‌ها در سه تکرار تقسیم‌شده و طول دوره آزمایش ۶۰ روز بود. نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ آزمایش انجام شد. نتایج مطالعه حاضر در ۶۰ روز پس از انجام واکسیناسیون حاکی از افزایش معنی‌دار سطح آنزیم‌های گوارشی تریپسین و آلفا-آمیلاز در تمام گروه‌ها نسبت به گروه شاهد بود. همچنین ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های مورد استفاده باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم کیموتریپسین در گروه‌های ویبریو تزریقی ($0/0 \pm 0/08$ U/mg) و غوطه‌وری ($0/0 \pm 0/06$ U/mg) نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. با این وجود نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار سطح آنزیم پروتئاز در گروه استرپ-قوطه‌وری ($210/1 \pm 7/48$ U/mg) و سطح آنزیم لیپاز در گروه استرپ-تزریقی ($210/1 \pm 7/48$ U/mg)، ویبریو-تزریقی ($218/3 \pm 84$ U/mg) و ویبریو-قوطه‌وری ($181/5 \pm 3/03$ U/mg) و است-ویبریو-قوطه‌وری ($246/3 \pm 84$ U/mg) نسبت به گروه شاهد بود. علاوه بر این، افزایش معنی‌دار سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه استرپ-تزریقی ($411/175 \pm 12/55$ U/mg) و ویبریو-قوطه‌وری ($416/191 \pm 78/95$ U/mg) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌دهد که واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی مخصوصاً به روش غوطه‌وری می‌تواند به‌طور مثبتی سطح آنزیم‌های گوارشی را در بچه ماهیان سی‌باس آسیایی بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: واکسن‌های غوطه‌وری، واکسن‌های تزریقی، آنزیم‌های گوارشی، ماهی سی‌باس آسیایی.

مقدمه

در سال‌های اخیر، پرورش ماهیان دریایی به یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های آبی‌پروری در مناطق گرمسیری تبدیل شده و تولید این گونه‌ها در بیشتر نقاط جهان رشد چشمگیری داشته است (Katavić, 2017). بیماری‌های عفونی به‌عنوان مهم‌ترین عامل در توسعه و پایداری هر مرکز آبی‌پروری در نظر گرفته می‌شود، زیرا این عامل هم به‌طور مستقیم به ماهیان آسیب وارد می‌کند و هم به‌طور غیرمستقیم تجارت را محدود کرده و کیفیت

یاسمن محمدی^۱

مهرزاد مصباح^۲

مژده چله مال دزفول نژاد^{۴*}

مهدی شمسانی مهرجان^۵

هومن رجبی اسلامی^۶

۱، ۵، ۶ گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳، ۲. مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۴. گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* مسئول مکاتبات:

mojdeh-chelemaaldezfoolnejad@iauahvaz.ac.ir

کد مقاله: ۱۴۰۰۴۰۹۱۸

تاریخ دریافت:

تاریخ پذیرش:

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

محصول را کاهش می‌دهد (Verschuere et al., 2000). استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌های عفونی مختلف منجر به مقاومت دارویی، آلودگی محیط‌زیست، تجمع در بدن ماهی و خطر برای سلامت مصرف‌کنندگان شده است (Cabello, 2006; Heydari et al., 2020; Romero et al., 2012). به همین دلیل یافتن راهی مطمئن برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی و بهبود سلامت و رشد ماهیان در صنعت آبی‌پروری ضروری است. یکی از مؤثرترین جایگزین‌ها برای درمان آنتی‌بیوتیکی علیه بیماری‌های عفونی در ماهی، استفاده از واکسن‌ها به‌عنوان عوامل بیولوژیکی غیر آلاینده است (Jiang et al., 2014; Nakanishi, 2020). واکسیناسیون به‌عنوان یک عامل ایجادکننده ایمنی طولانی‌مدت، به مهم‌ترین ابزار کنترل بیماری در صنعت آبی‌پروری تبدیل‌شده و از اواخر دهه ۱۹۳۰، تحقیقات مختلف منجر به تولید واکسن‌های مؤثر مختلف در صنعت آبی‌پروری شده است (Kayansamruaj et al., 2020; Evensen, 2016). اثربخشی واکسن‌های مختلف بسته به عامل بیماری‌زا، گونه ماهی و روش مصرف متفاوت بوده است. واکسن‌های ماهی معمولاً با روش‌های تجویز خوراکی، تزریقی و غوطه‌وری استفاده می‌شوند (Miccoli et al., 2019; Ji et al., 2020; Wang et al., 2020; Kayansamruaj et al., 2020). باین‌حال، واکسیناسیون ممکن است منجر به عوارض جانبی مانند کاهش اشتها، کاهش رشد، ایجاد استرس در ماهی و درنهایت مرگ‌ومیر شود (Juha et al., 2004). عوامل بیماری‌زای باکتریایی به‌ویژه جنس استرپتوکوکوس و ویبریو، تهدیدهای بالقوه جهانی برای آبی‌پروری دریایی بوده و یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های پایداری صنعت آبی‌پروری می‌باشند (Agnew and Barnes 2007; Mohamad et al., 2019). استرپتوکوکوزیس یک بیماری باکتریایی است که ماهیان پرورشی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در ماهیان آب‌های شیرین و دریایی بوده و خسارات اقتصادی قابل‌توجهی در نقاط مختلف جهان به بار آورده است (Agnew and Barnes, 2007). گونه‌های باکتریایی که باعث ایجاد این بیماری در جانوران آبی می‌شوند عبارت‌اند از: *Streptococcus iniae*، *S. parauberis*، *S. faecalis*، *S. agalactidae* و *S. dysgalactiae* (Nho et al., 2013; Agnew and Barnes, 2007; Osman et al., 2018). در میان گونه‌های باکتریایی ذکرشده، *S. iniae* یکی از فراوان‌ترین گونه‌ها در مزارع پرورش ماهی است. این باکتری یک عامل بیماری‌زا می‌باشد که نه‌تنها بر صنعت آبی‌پروری بلکه بر سلامت انسان نیز تأثیر می‌گذارد (Baiano and Barnes, 2009). *S. iniae* یک باکتری گرم مثبت کروی شکل بوده که متعلق به جنس استرپتوکوک است. این گونه یک باکتری بی‌حرکت، کاتالاز منفی، تخمیرکننده گلوکز و غیر اسپورساز است (Lau et al., 2006; Agnew and Barnes 2007). مطالعات بسیاری مرگ‌ومیر بالای مرتبط با عفونت *S. iniae* را در باس دریایی آسیایی در بسیاری از کشورها نشان داده‌اند (Agnew and Barnes, 2007; Kayansamruaj et al., 2015; Vi et al., 2013; Piamsomboon et al., 2020).

یکی دیگر از بیماری‌های باکتریایی مضر، ویبریوز می‌باشد. این بیماری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ماهی باس آسیایی در استرالیا، مالزی و اندونزی است (Gibson-Kueh et al., 2012). گونه‌های باکتریایی که باعث ایجاد ویبریوز در آبزیان می‌شوند عبارت‌اند از: *Vibrio anguillarum*، *V. ordalli* و *V. parahaemolyticus*. در میان این گونه‌های باکتریایی، *V. harveyi*، یکی از فراوان‌ترین گونه‌ها در ماهیان دریایی پرورشی است که به‌عنوان یک مشکل مهم در نظر گرفته‌شده و باعث زیان اقتصادی قابل‌توجهی در صنعت آبی‌پروری در سراسر جهان می‌شود (Mohamad et al., 2019). *V. harveyi* یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و عامل اصلی بیماری ویبریوز در ماهیان دریایی مانند *Lates calcalifer*، *Rachycentron canadum*، *Negaprion brevirostris*، *Epinephelus coioides* و *Sciaenops ocellatus* و غیره است. این بیماری در حال حاضر یک مشکل عمده در آبی‌پروری ماهیان دریایی در آسیای جنوب شرقی، به‌ویژه در سیستم پرورش در قفس می‌باشد (Mohamad et al., 2019; Austin and Austin 2016).

ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*) که باراموندی نیز نامیده می‌شود، ماهی دریایی ارزشمندی است. این ماهی یک‌گونه مهم و تجاری صنعت آبی‌پروری جنوب شرقی آسیا است که به‌طور گسترده در استرالیا، تایلند و اندونزی پرورش داده می‌شود. باس دریایی به دلایل

مختلف مانند پرورش در طیف وسیعی از شوری‌ها، تولیدمثل در اسارت، سرعت رشد سریع و قیمت مناسب محصول در بازار، یک گونه ماهی مناسب برای پرورش یوری‌ها لاین است (Glencross, 2006؛ Yue et al., 2001؛ Jerry, 2013). بالین‌حال، علیرغم ویژگی‌های بیولوژیکی مطلوب این‌گونه برای پرورش، مقاومت ضعیف این‌گونه در برابر بسیاری از بیماری‌های عفونی از جمله باکتری‌های ویبریو و استرپتوکوک باعث خسارات اقتصادی بالایی شده است (Jerry, 2013؛ Norhariani et al., 2019؛ Khang et al., 2019؛ Mohamad et al., 2019؛ Thu Lan et al., 2021).

با توجه به اینکه در بسیاری از منابع، آلودگی توأم باکتری ویبریوزیس و استرپتوکوکوزیس در ماهی باس دریایی گزارش شده است و از طرف دیگر واکسیناسیون مؤثرترین روش جهت کنترل بیماری‌های تهدیدآمیز در صنعت آبی‌پروری می‌باشد (Brudeseth, 2013)، استفاده از واکسن علیه این دو باکتری بهترین گزینه موجود جهت پیشگیری است. تاکنون مطالعات زیادی روی واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*) و ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*) در گونه‌های مختلف و به روش‌های مختلف از جمله تزریقی و غوطه‌وری انجام شده است (Wang et al., 2019؛ Thu Lan et al., 2020؛ Halimi et al., 2020). از طرف دیگر آنزیم‌های گوارشی ارتباط مستقیم با رشد و وضعیت سلامت ماهی در شرایط مختلف محیطی و داخلی دارند. درواقع میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی از عوامل مهم تأثیرگذار در نرخ رشد بوده و می‌تواند نقش محدودکننده‌ای داشته باشد. ازجمله محدود مطالعاتی که در این زمینه انجام گرفته می‌توان به تحقیق Rungruangsak-Torrissen و همکاران (2009) روی اثر واکسن‌های مختلف بر آنزیم‌های گوارشی در گونه *Salmo salar* اشاره کرد؛ بنابراین با توجه به اهمیت ماهی باس دریایی آسیایی در ایران و این مهم که تاکنون در رابطه با اثر واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس/اینیه (*Streptococcus iniae*) و ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*) بر آنزیم‌های گوارشی در این‌گونه تحقیقی صورت نگرفته است، همچنین برای یافتن اینکه کدامیک از این واکسن‌ها و روش بکار گرفته شده اثر مثبت و متعادل‌کننده‌تری بر آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی دارد، این مطالعه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۲۰ قطعه ماهی باس دریایی آسیایی در پاییز ۱۳۹۸ از یکی از مزارع پرورشی واقع در شهر اهواز با وزن متوسط $37 \pm 35/20$ گرم تهیه و تحت شرایط مناسب به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی شهید چمران انتقال داده شد. برای اطمینان از سلامت ماهی‌ها علاوه بر بررسی‌های انگلی و قارچی، از کلیه قدامی و مغز ۵ عدد ماهی نمونه باکتریایی در محیط TSA و ژلوز خون‌دار کشت داده شد که با توجه به عدم رشد باکتریایی از عدم حضور عفونت پنهان اطمینان حاصل گردید. قبل از شروع تحقیق ماهیان به مدت دو هفته جهت سازگاری در مخازن ۳۰۰ لیتری نگهداری شده و سپس به مدت ۶۰ روز با خوراک تجاری (شرکت فرادانه) و روزانه به میزان دو بار در روز و تا حد سیری مورد تغذیه قرار گرفتند. فاکتورهای شیمیایی آب برای همه گروه‌ها یکسان و شامل اکسیژن محلول $3 \pm 0/1$ میلی گرم، دما $28/5 \pm 0/5$ درجه سانتی گرد و $7/4 \pm 0/4$ pH بود. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب از دستگاه کالری متر هک (مدل ۸۹، شرکت Hach، کشور آمریکا) و pH متر مدل متروهم (مدل ۷۸۱، Metrohm، کشور سوئیس) استفاده گردید. ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به ۷ تیمار در سه تکرار تقسیم شدند (جدول ۱)، به‌طوری‌که هر تکرار شامل ۲۰ قطعه بچه ماهی بود. هر تکرار شامل یک مخزن ۳۰۰ لیتری با ورودی آب ۰/۷ لیتر در ثانیه بود که از طریق یک شیر آب قابل تنظیم تأمین می‌شد.

جدول ۱: نحوه تیمار بندی آزمایش در یکی از مزارع پرورش ماهی در سال ۱۳۹۸.

نام گروه	نوع واکسن	تعداد ماهی در هر گروه
شاهد	ماهیان دریافت‌کننده بافر فسفات	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
استرپ تزریقی	ماهیان ایمن شده با واکسن/استرپتوکوکوس اینیه (<i>Streptococcus iniae</i>) به روش تزریقی	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
ویبریو تزریقی	ماهیان ایمن شده با واکسن ویبریو هارویی (<i>Vibrio harveyi</i>) به روش تزریقی	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
ویبریو غوطه‌وری	ماهیان ایمن شده با واکسن ویبریو هارویی (<i>Vibrio harveyi</i>) به روش غوطه‌وری	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
استرپ غوطه‌وری	ماهیان ایمن شده با واکسن/استرپتوکوکوس اینیه (<i>Streptococcus iniae</i>) به روش غوطه‌وری	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
است-ویبر تزریقی	ماهیان ایمن شده با واکسن دوگانه/استرپتوکوکوس اینیه / ویبریو هارویی به روش تزریقی	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)
است-ویبر غوطه‌وری	ماهیان ایمن شده با واکسن دوگانه/استرپتوکوکوس اینیه / ویبریو هارویی به روش غوطه‌وری	۶۰ (۲۰ عدد در هر تکرار)

ایمن‌سازی در روزهای صفر و ۱۴ انجام و ماهیان واکسینه شده تا ۶۰ روز نگهداری شدند. به‌منظور انجام واکسیناسیون، ابتدا ماهیان با نسبت ۰/۴ میلی‌لیتر فنوکسی اتانول در یک لیتر آب بی‌هوش گشتند. سپس در روش تزریقی ۱۰۰ میکرو لیتر از واکسن به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روش غوطه‌وری، ماهیان به مدت ۱۰ دقیقه با غلظت ۱۰^۹ باکتری فرمالین (باکتری کشته‌شده با فرمالین) در میلی‌لیتر غوطه‌ور گشتند. در مرحله دوم ایمن‌سازی (روز ۱۴) در روش غوطه‌وری، واکسن به نسبت ۱ به ۱۰ در آب رقیق و ماهی‌ها به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون واکسن غوطه‌ور شدند. به گروه کنترل در روش تزریقی ۱۰۰ میکرو لیتر سرم فیزیولوژی به‌جای واکسن تزریق و در روش غوطه‌وری، غوطه‌ور شدن ماهیان در آب بدون واکسن صورت گرفت (Halimi et al., 2020; Mohammadi et al., 2021).

به‌منظور بررسی مقادیر آنزیم‌های گوارشی در ماهیان تیمارهای مختلف، در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ به‌طور تصادفی، تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار انتخاب شد. ماهیان با حوله خشک و سپس توزین و آسان‌کشی شدند. در نهایت ماهیان تشریح و از اندام روده نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی (۰/۹٪ NaCl) شسته شدند و سریعاً درون میکروپیپت‌های برچسب‌گذاری شده تا زمان سنجش در فریزر ۸۰- نگهداری شد. به‌منظور عصاره‌گیری از نمونه‌های بافتی، نمونه‌های فریز شده توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و قبل از ذوب شدن کامل، به نسبت یک به نه (w/v) با بافر همگن‌سازی (۱۰۰ Tris-HCl میلی‌مولار، ۰/۱ EDTA میلی‌مولار، ۰/۱ Triton X-100 درصد با pH=۷/۸) مخلوط شده، نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (مدل D 500) هموژن شدند (Rungruangsak, 2002). سپس محصول هموژن شده به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در چهار درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. در نهایت از مایع رویی (عصاره‌ی آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد. پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده به روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد. به این منظور از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید.

جهت سنجش آنزیم فسفاتاز قلیایی از کیت آلکالین فسفاتاز (۵۰۳-۱۰ Zist Chem. Ref: استفاده شد. مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر از بافر بی‌کربنات را با ۱۰۰ میکرو لیتر معرف پارا-نیتروفنیل فسفات Par-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط شد و پنج دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و ۲۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی استخراج‌شده به آن اضافه گردیده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس‌ازاین زمان پنج میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه شد تا واکنش متوقف شود و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله آزمایش اضافه گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسین از سوبسترای ان- بنزوئیل-ال- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. این سوبسترا تحت تأثیر آنزیم تریپسین تجزیه و به ان- بنزوئیل-ال- آرژنین تبدیل می‌شود. برای این کار ابتدا ۱۸۰ میکرو لیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰ میکرو لیتر از اسیدکلریدریک یک میلی‌مولار مخلوط، سپس برای هم‌دمایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد ۳۰ میکرو لیتر از نمونه رقیق‌شده (به نسبت یک به ۲۰) به محلول فوق اضافه گردید و دانسته‌ی نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل 2802 UV) در

طول موج ۲۵۳ نانومتر در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم تریپسین برحسب تغییر میزان جذب، به دنبال شکستن BAE در مدت یک دقیقه در طول موج ۲۵۳ نانومتر، محاسبه شد (Worthington, 1991).

برای تعیین فعالیت آنزیم کیموتریپسین از بنزوئیل-آل-تیروزین اتیل استر (BTEE) به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم کیموتریپسین تجزیه و به این-بنزوئیل-آل-تیروزین و اتانول تبدیل می‌شود. برای این کار ابتدا ۱/۴ سی‌سی از محلول سوبسترا، به ۱/۵ سی‌سی بافر تریس در لوله آزمایش اضافه شد و در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت چهار الی پنج دقیقه برای هم‌دمایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم کیموتریپسین، بر اساس مقدار آنزیم که یک میکرو مول BTEE در مدت یک دقیقه هیدرولیز می‌کند، محاسبه شد (Erlanger et al., 1961).

برای تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. در این واکنش نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه‌شده و تولید مالتوز می‌نماید که میزان تولید مالتوز در واحد زمان در حضور معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید و با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز سنجیده می‌شود. برای تعیین فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ابتدا ۲۵۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی رقیق‌شده (با نسبت ۱:۲۰) با آب مقطر سرد و ۲۵۰ میکرو لیتر از نشاسته یک درصد به یک لوله آزمایش و ۲۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرو لیتر از نشاسته یک درصد نیز به لوله دیگری به‌عنوان شاهد اضافه شد. لوله‌ها سه دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به دمای تعادل برسند. بعد از سه دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، ۲۵۰ میکرو لیتر از معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و هر دو لوله به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن، ۲۵۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی به لوله‌ی شاهد اضافه و سپس لوله‌ها در دمای اتاق خنک شدند و ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید. محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری مشاهده‌شده در منحنی استاندارد مالتوز (نمودار یک ضمیمه) قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به دست آمد. واحد فعالیت آلفا-آمیلاز، برحسب میلی گرم مالتوز آزادشده تحت اثر آنزیم آلفا-آمیلاز در مدت سه دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه شد (Bernfeld, 1951; Worthington, 1991).

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن‌زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم لیپاز تجزیه و به دی‌گلیسرید و اسید چرب تبدیل می‌شود. بدین منظور روغن‌زیتون آزمایشگاهی (فلوکا Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم نیاز به بافر ۰/۸ مولار اسید هیدروکلریک-تریس Tris-HCl، محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی مولار و معرف تیمول فتالین ۰/۹٪ بود. برای این کار دو لوله آزمایش T (Test) و B (Blank)، ۱/۵ میلی لیتر امولسیون روغن‌زیتون، ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر بافر تریس اضافه و مخلوط گردید. مقدار ۰/۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی جداشده به درون لوله T ریخته شد و هر دو لوله ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا در این مدت عمل هضم چربی‌ها توسط لیپاز صورت گیرد. به‌صورت جداگانه ۰/۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی از قبل تهیه‌شده را در یک ارلن ۵۰ میلی لیتری قرار داده و علامت B بر روی آن نوشته شد و بلافاصله به درون یخچال قرار داده شد تا خنک شود. بعد از اتمام مدت‌زمان انکوباسیون درون بن‌ماری محتویات لوله B به ارلن مایر داخل یخچال و محتویات لوله T به ارلن مایر دیگری (T) انتقال داده شد. سپس لوله‌های آزمایش با یک میلی لیتر اتانول ۹۵٪ به‌خوبی شسته و روی ارلن‌های مربوطه ریخته و مخلوط شد. سپس به هر ارلن چهار قطره معرف تیمول فتالین اضافه شد و سپس در یک بورت تمیز محلول هیدروکسید سدیم ریخته و تا ایجاد رنگ آبی روشن بر روی هریک از ارلن‌ها تیتراسیون انجام گرفت و میزان هیدروکسید سدیم مصرفی ثبت شد و میزان فعالیت لیپاز محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا نرمال بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov - Smirnov سنجیده شد. سپس داده‌ها به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بررسی شدند. با مشاهده اختلاف بین داده‌ها از پس آزمون توکی برای تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف موجود بین تیمارهای مورد مطالعه در سطح ۹۵ درصد استفاده شد ($P < 0.05$).

نتایج

نتایج سنجش آنزیم‌های گوارشی بافت روده ماهی باس دریایی آسیایی در جدول ۲ آورده شده است. در نتایج مربوط به سنجش آنزیم‌های گوارشی، در تمام شاخص‌ها در روز صفر آزمایش تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

آنالیز داده‌های مربوط به آنزیم‌های گوارشی در پایان روز ۳۰ ام نشان داد که مقدار آنزیم کیموتریپسین در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). کمترین مقدار آنزیم کیموتریپسین در تیمار اول (گروه کنترل) و گروه استرپ-ویبریو تزریقی و بیشترین مقدار آن در تیمارهای ویبریو تزریقی و ویبریو غوطه‌وری در پایان روز ۶۰ ام مشاهده شد ($P < 0.05$). در پایان آزمایش افزایش در میزان آنزیم کیموتریپسین در تیمارهای ویبریو تزریقی و ویبریو غوطه‌وری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

آنالیز داده‌های مربوط به آنزیم تریپسین در پایان روز ۳۰ ام افزایش معنی‌داری را در تیمارهای استرپ تزریقی و ویبریو تزریقی نسبت به گروه کنترل داشته ($P < 0.05$) و کمترین مقدار این آنزیم در تیمار استرپ غوطه‌وری مشاهده شد. نسبت به شروع آزمایش مقدار آنزیم تریپسین در تیمارهای ویبریو تزریقی افزایش از خود نشان دادند ($P < 0.05$) اما این تیمارها در پایان روز ۶۰ ام با کاهش معنی‌داری نسبت به روز ۳۰ ام در مقدار آنزیم تریپسین مواجه شد ($P < 0.05$) که البته نسبت به شروع آزمایش مقدار این آنزیم افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). بیشترین مقدار تریپسین در پایان روز ۶۰ ام در تیمار استرپ-ویبریو تزریقی مشاهده شد.

آنالیز نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری مقدار آنزیم آلفا آمیلاز نشان داد که در روز ۳۰ ام، تیمارهای استرپ غوطه‌وری و استرپ-ویبریو تزریقی دارای بیشترین مقدار آنزیم آلفا آمیلاز بودند و مقدار آن نسبت به شروع آزمایش افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). این در حالی بود که تیمار ویبریو تزریقی در پایان روز ۳۰ دارای کمترین میزان نسبت به سایر تیمارها بود. در پایان روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

آنالیز داده‌های مربوط به آنزیم لیپاز در پایان روز ۳۰ ام افزایش معنی‌داری را در تیمار استرپ تزریقی نسبت به گروه کنترل داشته ($P < 0.05$) و کمترین مقدار این آنزیم در تیمار کنترل مشاهده شد. نسبت به شروع آزمایش مقدار آنزیم لیپاز در تیمارهای استرپ-ویبریو تزریقی افزایش از خود نشان دادند ($P < 0.05$) اما این تیمارها در پایان روز ۶۰ ام با کاهش معنی‌داری نسبت به روز ۳۰ ام در مقدار آنزیم لیپاز مواجه شد ($P < 0.05$). بیشترین مقدار لیپاز در پایان روز ۶۰ ام در تیمار استرپ-ویبریو غوطه‌وری اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها جهت بررسی میزان پروتئاز در روز ۳۰ ام نشان داد که تیمار استرپ غوطه‌وری نسبت به گروه اول (کنترل) و سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در بررسی میزان پروتئاز در روز ۶۰ ام نیز تیمار استرپ غوطه‌وری با گروه کنترل و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). در پایان آزمایش با بررسی تیمارهای مختلف نشان داده شد که میزان پروتئاز در تیمار استرپ غوطه‌وری در روز ۶۰ ام بیشترین مقدار را نسبت به روز شروع آزمایش داشته ($P < 0.05$) ولی اختلاف معنی‌داری در بین آزمایش روز ۳۰ ام و روز ۶۰ در میزان آنزیم پروتئاز ثبت نگردید ($P > 0.05$).

نتایج نشان دادند که در پایان روز ۳۰ ام مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز در همه تیمارهای آزمایش نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار بوده ($P < 0.05$) و با یکدیگر نیز اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). بیشترین میزان این آنزیم در تیمارهای ویبریو غوطه‌وری ($P < 0.05$) و کمترین مقدار این آنزیم در تیمار کنترل مشاهده شد. در روز ۶۰ آزمایش نسبت به شروع آزمایش مقدار این آنزیم در تیمارهای استرپ تزریقی و ویبریو غوطه‌وری افزایش از خود نشان داد ($P < 0.05$) اما تیمار ویبریو غوطه‌وری در پایان روز ۶۰ ام با کاهش معنی‌داری نسبت به روز ۳۰ ام در مقدار این آنزیم مواجه شد ($P < 0.05$).

جدول ۲: اثر واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*S. iniae*) و ویبریو هاروی (V.)*harveyi*) بر آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*).

شاخص	تیمار	روز ۰	روز ۳۰	روز ۶۰
کیموتریپسین (U/mg)	شاهد	۰/۰±۰.۲۳/۰.۰۹ ^{A,a}	۰/۰±۰.۲۴/۰.۰۳ ^{A,a}	۰/۰±۰.۲۴/۰.۱۵ ^{B,a}
	استرپ تزریقی	۰/۰±۰.۲۶/۰.۰۵ ^{A,ab}	۰/۰±۰.۱۹/۰.۰۲ ^{A, b}	۰/۰±۰.۴۸/۰.۰۴ ^{AB, a}
	ویبریو تزریقی	۰/۰±۰.۲۴/۰.۰۸ ^{A,b}	۰/۰±۰.۲۱/۰.۰۶ ^{A,b}	۰/۰±۰.۶۱/۰.۰۸ ^{A,a}
	ویبریو غوطه‌وری	۰/۰±۰.۲۵/۰.۱۴ ^{A,b}	۰/۰±۰.۳۱/۰.۰۵ ^{A,b}	۰/۰±۰.۰۶/۰.۱۹ ^{A,a}
	استرپ غوطه‌وری	۰/۰±۰.۲۳/۰.۰۹ ^{A,b}	۰/۰±۰.۲۱/۰.۰۳ ^{A,b}	۰/۰±۰.۳۶/۰.۱۵ ^{AB,a}
	است-ویبر تزریقی	۰/۰±۰.۲۴/۰.۰۵ ^{A,a}	۰/۰±۰.۲۴/۰.۰۲ ^{A, a}	۰/۰±۰.۲۳/۰.۰۴ ^{B, a}
تریپسین (U/mg)	است-ویبر غوطه‌وری	۰/۰±۰.۲۶/۰.۰۸ ^{A,b}	۰/۰±۰.۲۲/۰.۰۶ ^{A,b}	۰/۰±۰.۴۲/۰.۰۸ ^{AB,a}
	شاهد	۲۲/۳±۶۹/۶۸ ^{A,a}	۲۳/۷±۸/۵۳ ^{C, a}	۲۰/۴±۰.۸/۳۶ ^{E,ab}
	استرپ تزریقی	۲۴/۲±۶۴/۹۳ ^{A,b}	۳۵/۴±۰.۱/۳۱ ^{B, ab}	۵۲/۲±۶۲/۷ ^{C, a}
	ویبریو تزریقی	۲۲/۱±۹۷/۸۳ ^{A,c}	۱۱۵/۲±۳/۲ ^{A, a}	۵۰/۰±۵۹/۶۶ ^{C,b}
	ویبریو غوطه‌وری	۲۴/۳±۲/۱۹ ^{A,b}	۱۳/۴±۱/۹۷ ^{D, b}	۴۰/۱±۲۴/۹۸ ^{CD,a}
	استرپ غوطه‌وری	۲۲/۳±۶۹/۶۸ ^{A,b}	۷/۰±۸/۵۳ ^{D, c}	۵۰/۴±۰.۸/۳۶ ^{C,a}
آلفا آمیلاز (U/mg)	است-ویبر تزریقی	۲۴/۲±۶۴/۹۳ ^{A,b}	۱۴/۴±۰.۱/۳۱ ^{D, b}	۱۲۸/۲±۱/۲ ^{A, a}
	است-ویبر غوطه‌وری	۲۲/۱±۹۷/۸۳ ^{A,b}	۱۲/۲±۳/۲ ^{D, b}	۱۰۰/۰±۰۹±۵/۶ ^{B,a}
	شاهد	۱۰۱/۱۲±۷/۲۳ ^{A,a}	۹۹/۱۲±۴۵/۱۸ ^{C,a}	۱۰۲/۷±۶/۱۰ ^{E,a}
	استرپ تزریقی	۱۰۰/۲±۵/۰.۳ ^{A,b}	۹۵/۳±۴۹/۴۸ ^{C, b}	۲۰۱/۷±۷/۲۳ ^{C,a}
	ویبریو تزریقی	۱۰۳/۱۶±۱۳/۳۲ ^{A,b}	۸۵/۴±۴۳/۴۱ ^{C,b}	۲۴۹/۱۲±۷/۲ ^{BC,a}
	ویبریو غوطه‌وری	۱۰۴/۹±۶/۰.۱ ^{A,ab}	۸۹/۳±۷۸/۸۶ ^{C, b}	۲۰۱/۱۹±۷/۹ ^{AB,a}
لیپاز (U/mg)	استرپ غوطه‌وری	۱۰۴/۱۲±۷/۲۳ ^{A,b}	۲۶۵/۱۲±۴۵/۱۸ ^{A,a}	۲۱۸/۷±۶/۱۳ ^{BC,a}
	است-ویبر تزریقی	۱۰۵/۲±۵/۰.۳ ^{A,b}	۱۴۱/۳±۴۹/۴۸ ^{B, a}	۱۵۱/۷±۴/۳ ^{D,a}
	است-ویبر غوطه‌وری	۱۰۱/۱۶±۱۳/۳۲ ^{A,b}	۹۱/۴±۴۳/۴۱ ^{C,b}	۳۶۰/۱۲±۹/۲۷ ^{A,a}
	شاهد	۹۸/۱±۸۶/۵ ^{A,a}	۹۹/۰±۰.۸/۸۷ ^{B,a}	۹۶/۱±۸/۵ ^{B,a}
	استرپ تزریقی	۹۱/۱±۷/۴۸ ^{A,c}	۱۶۳/۰±۶۴/۱۸ ^{A,b}	۲۱۰/۱±۷/۴۸ ^{A,a}
	ویبریو تزریقی	۹۷/۳±۸۴ ^{A,c}	۱۵۶/۱±۰.۴/۰.۷ ^{AB,b}	۲۱۸/۳±۸۴ ^{A,a}
پروتئاز (U/mg)	ویبریو غوطه‌وری	۹۶/۵±۲۳/۰.۳ ^{A,b}	۱۴۱/۰±۱۴/۸۴ ^{AB,a}	۱۸۱/۵±۳/۰.۳ ^{A,a}
	استرپ غوطه‌وری	۹۷/۱±۸۶/۵ ^{A,b}	۱۲۸/۰±۰.۸/۸۷ ^{AB,a}	۹۴/۱±۸۶/۵ ^{B,b}
	است-ویبر تزریقی	۹۷/۱±۵/۴۸ ^{A,b}	۱۳۹/۰±۶۴/۱۸ ^{AB,a}	۸۷/۱±۵/۴۸ ^{B,b}
	است-ویبر غوطه‌وری	۹۷/۳±۸۴ ^{A,b}	۱۱۸/۱±۰.۴/۰.۷ ^{AB,b}	۲۴۶/۳±۸۴ ^{A,a}
	شاهد	۲/۰±۲/۲۶ ^{A,a}	۲/۰±۳/۷۱ ^{B,a}	۲/۰±۲/۱۱ ^{B,a}
	استرپ تزریقی	۲/۰±۶/۶۸ ^{A,a}	۱/۰±۲/۳۳ ^{B,a}	۱/۰±۲/۳۱ ^{B,a}
آکالین فسفاتاز (U/mg)	ویبریو تزریقی	۲/۰±۵/۱ ^{A,a}	۱/۰±۵/۵۸ ^{B,a}	۱/۰±۴۹/۶۶ ^{B,a}
	ویبریو غوطه‌وری	۲/۱±۸/۶۳ ^{A,a}	۳/۰±۳۱/۷۳ ^{B,a}	۳/۰±۴۶/۹۸ ^{B,a}
	استرپ غوطه‌وری	۲/۰±۲۵/۱۶ ^{A,b}	۱۴/۳±۱۸/۷۱ ^{A,a}	۱۴/۴±۰.۲/۱۱ ^{A,a}
	است-ویبر تزریقی	۲/۰±۶/۶ ^{A,b}	۴/۰±۵/۵۳ ^{B,a}	۴/۱±۷۳/۰.۱ ^{B,a}
	است-ویبر غوطه‌وری	۲/۰±۲۵/۱ ^{A,a}	۲/۰±۳۲/۷۸ ^{B,a}	۲/۰±۳۶/۸۶ ^{B,a}
	شاهد	۱۰۰/۲۴±۷۴/۸۵ ^{A,a}	۹۷/۲۴±۴۸/۷۵ ^{D,a}	۹۹/۲۳±۷۴/۴۱ ^{B,a}
	استرپ تزریقی	۹۸/۱۱±۴۸/۷۵ ^{A,c}	۲۷۹/۸۹±۵۶/۲۵ ^{C,b}	۴۱۱/۱۷۵±۱۲/۵۵ ^{A,a}
	ویبریو تزریقی	۹۷/۳۳±۵۶/۳ ^{A,c}	۵۹۸/۱۶۶±۶۶/۵۶ ^{A,a}	۲۳۳/۷۶±۰.۶/۲۶ ^{B,b}

اثر واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*) و ... / محمدی و همکاران

شاخص	تیمار	روز ۰	روز ۳۰	روز ۶۰
ویبریو غوطه‌وری		۱۰۴/۳۵±۷۴/۶۵ ^{A,c}	۷۳۱/۹۴±۰۶/۷۸ ^{A,a}	۴۱۶/۱۹۱±۷۸/۹۵ ^{A,b}
استرپ غوطه‌وری		۹۸/۲۹±۷۴/۸۵ ^{A,b}	۴۳۷/۷۴±۴۸/۷۵ ^{B,a}	۱۳۸/۳۷±۷۴/۴۱ ^{B,b}
است-ویبر تزریقی		۹۷/۱۴±۴۸/۷۵ ^{A,b}	۶۰۶/۱۳۴±۵۶/۳۵ ^{A,a}	۱۳۷/۵۹±۱۲/۵۵ ^{B,b}
است-ویبر غوطه‌وری		۹۷/۱۴±۵۶/۳۵ ^{A,b}	۳۰۳/۹۶±۶۶/۵۶ ^{BC,a}	۲۲۷/۹۶±۰۶/۲۶ ^{B,a}

حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون است ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت پرورش ماهی باس دریایی در کشور و وجود بیماری استرپتوکوکوزیس و ویبریوزیس در قفس‌های پرورشی، با توجه به اطلاعات موجود این مطالعه اولین تحقیقی است که بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی به دنبال ایمن زایی با واکسن غیرفعال شده استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی در دو شکل تک‌واحدی و دوگانه (دی‌والان) انجام شده است. از طرف دیگر، مجرای گوارشی نقش مهمی در هضم و جذب مواد غذایی داشته و در نتیجه بر روی رشد و سلامت جانور تأثیر دارد؛ بنابراین فرآیند هضم در سیستم گوارش انجام شده و در طی انجام آن آنزیم‌های گوارشی به‌عنوان مهم‌ترین عامل دارای اهمیت می‌باشند. بیشترین هضم آنزیمی مواد غذایی در روده انجام می‌شود که این آنزیم‌ها می‌توانند از پانکراس (هپاتوپانکراس) و یا سلول‌های روده‌ای (آنتروست) ترشح شوند. از جمله آنزیم‌های مهم گوارشی تریپسین، کیموتریپسین، آلفا-آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز می‌باشند. باین وجود اطلاعات موجود در زمینه رفتار این آنزیم‌های گوارشی و سطوح فعالیت آن‌ها پس از دریافت انواع واکسن در ماهیان بسیار اندک است؛ بنابراین مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته بر روی سایر محرک‌های ایمنی انجام گرفته است.

پروتئاز آنزیمی است که پروتئین‌ها را به پلی پپتیدهای کوچک‌تر یا اسیدهای آمینه منفرد تجزیه می‌کند و باعث تشکیل محصولات پروتئینی جدید می‌شود. این آنزیم این کار را با شکستن پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها با هیدرولیز انجام می‌دهد، واکنشی که در آن آب پیوندها را می‌شکند (Assan et al., 2022). در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم پروتئاز در گروه استرپ- غوطه‌وری نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. مشابه مطالعه حاضر، مطالعات بسیاری گزارش دادند که استفاده از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در گونه‌های مختلف ماهی ز جمله تیلاپیا (Midhun et al., 2016) و کپور معمولی (Zemheri-Navruz et al., 2020) می‌شود. تریپسین یک پروتئاز سرینی است که در لوله گوارش بسیاری از مهره‌داران یافت می‌شود و عمل هیدرولیز پروتئین‌ها را انجام می‌دهد. این آنزیم در پانکراس به‌صورت پرو آنزیم‌های تریپسینوژن غیرفعال تولید می‌شود. تریپسین زنجیره‌های پپتید را در محل کربوکسیل آمینواسیدهای لیزین یا آرژنین می‌شکافد. این آنزیم در فرآیندهای بیوتکنولوژی زیادی کاربرد دارد. فرآیند هضم پروتئین توسط تریپسین را عموماً پروتئولیز تریپسین یا Trypsinisation می‌گویند. فعال‌سازی زمانی اتفاق می‌افتد که یک پپتید کوچک (بسته به گونه دارای ۱۰-۴ اسید آمینه) از مولکول تریپسینوژن حذف شود. تریپسین تنها آنزیم پانکراسی است که می‌تواند آنزیم‌های دیگر دستگاه گوارش را فعال کند (Corring, 1998). تریپسین غالب‌ترین آنزیم هضم پروتئین در روده و یک اندوپپتیداز می‌باشد. در مطالعه حاضر ایمن‌سازی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*S. iniae*) و ویبریو هاروی (*V. harveyi*) باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم تریپسین در تمام گروه‌ها

نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. موارد مشابهی از توانایی افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در گونه‌های مختلف ماهی پس از استفاده از محرک‌های مختلف ایمنی مشاهده شده است (Abdel-Tawwab *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Mohammadian *et al.*, 2021; Jang *et al.*, 2019). کیموتریپسین یکی دیگر از آنزیم‌های هضمی پروتئین در روده است که عمل پروتئولیز را می‌تواند انجام دهد، کیموتریپسین مانند تریپسین یک اندوپتیداز است و در پانکراس توسط بیوسنتز پروتئین ساخته و به صورت کیموتریپسینوزن غیرفعال تولید می‌گردد. کیموتریپسین در اکثر ماهیانی که در آن‌ها تریپسین یافت می‌شود، دیده شده است (Zhou *et al.*, 2011). در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم کیموتریپسین در گروه‌های تزریقی و غوطه‌وری نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. در راستای تحقیق حاضر، بسیاری از مطالعات گزارش دادند که استفاده از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت این آنزیم در گونه‌های مختلف ماهی شده است (Tan *et al.*, 2011; Reyshari *et al.*, 2019; Ahmadifar *et al.*, 2019). احتمالاً واکسن‌های استفاده شده از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری‌ها و بهبود تعادل میکروبی روده باعث بهبود هضم و جذب مواد غذایی و مصرف غذا شدند و به این وسیله توانسته‌اند سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره غذایی ماهیان باس دریایی آسیایی شوند و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین و پس‌از آن تریپسین که از پروتئازها هستند را افزایش دهند.

آلفا-آمیلاز جزء آنزیم‌های آمیلولیتیک می‌باشد که پیوندهای آلفایی مانند پلی‌ساکاریدها مانند نشاسته و گلیکوژن و بافت‌های گلوکزی و مالتوزی را هیدرولیز می‌کند. فعالیت آمیلاز در ماهی به نظر می‌رسد که مستقیماً با سطوح کربوهیدرات و ترکیب رژیم غذایی آن‌ها ارتباط دارد (Assan *et al.*, 2022). در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم کیموتریپسین در تمام گروه‌ها نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. مشابه مطالعه حاضر، مطالعات مختلفی نشان دادند که استفاده از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در گونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (Mohammadian *et al.*, 2021)، کفال خاکستری (Akbari *et al.*, 2018) و تیلاپیا (Midhun *et al.*, 2016) می‌شود. نتایج حاضر می‌تواند به این دلیل باشد که واکسن‌های استفاده شده در مطالعه حاضر از طریق افزایش ایمنی باعث بهبود عملکرد تغذیه شده و به دنبال آن باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شدند.

لیپاز یکی از آنزیم‌های لیپولیتیکی مهم می‌باشد و مسئول کاتالیز کردن باندهای کربوکسی - استری مولکول‌هایی مانند تری-گلیسرول، استرهای کلسترول یا چربی‌های محلول در استرهای ویتامین است (Assan *et al.*, 2022). در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم لیپاز در گروه استرپ-تزریقی، ویبریو-تزریقی، ویبریو-غوطه‌وری و است-ویبر غوطه‌وری نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. در راستای تحقیق حاضر، مطالعات بسیاری گزارش کردند که استفاده از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت آنزیم لیپاز در گونه‌های مختلف ماهی شده است (Sotoudeh *et al.*, 2020; Mohammadian *et al.*, 2021; Akbari and Shahraki, 2019). در مطالعه حاضر، احتمالاً استفاده از واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه باعث تحریک بیشتر دستگاه گوارش ماهی باس دریایی آسیایی برای ترشح بیشتر لیپاز شده است.

آلکالین فسفاتاز آنزیم هیدرولیز کننده‌ای است که مسئول حذف گروه فسفات بسیاری از مولکول‌ها مانند نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها و آکالوئیدها است. این آنزیم توسط سلول‌های انتروسیست بالغ غشای لبه مسواکی تولید می‌شود که شاخص عملکرد سلول‌های انتروسیست روده است. این سلول‌ها دارای آنزیم‌های گوارشی برای هضم مواد غذایی و پروتئین‌های حامل برای جذب مواد غذایی هضم شده هستند، که در نهایت افزایش عملکرد این سلول‌ها و ترشح بیشتر آنزیم‌ها بخصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز سبب رشد بیشتر موجود می‌شود.

(Krogdahl and Marie Bakke-McKellep, 2005; Nya and Austin, 2011). در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی با واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه و ویبریو هاروی باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه استرپ-تزریقی و ویبریو- غوطه‌وری نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایشی شد. مطالعات بسیاری نشان دادند که استفاده از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گونه‌های مختلف ماهی شده است (Mohammadian et al., 2019; Mohammadian et al., 2021). فعالیت بالاتر آلکالین فسفاتاز روده نشان‌دهنده جذب بیشتر مواد مغذی در انتروسیست ماهی است که برای جذب کربوهیدرات و همچنین جذب چربی مهم است (Calhau et al., 2000; Gawlicka et al., 2000). به‌طور کلی، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی برای افزایش هضم ماکرو مولکول‌ها و در نتیجه تسهیل جذب مواد مغذی در مجرای روده گزارش شده است (Jang et al., 2019).

بر اساس یافته‌های به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که واکسن‌های استفاده‌شده در مطالعه حاضر احتمالاً از طریق افزایش ایمنی و به دنبال آن بهبود عملکرد تغذیه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی به‌ویژه آنزیم‌های تریپسین و آلفا-آمیلاز می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد که استفاده از واکسن ویبریو غوطه‌وری نتایج بهتری را نسبت سایر واکسن‌ها روی آنزیم‌های گوارشی روده ماهی باس دریایی آسیایی دارد. علاوه بر این نتایج این مطالعه روند یکپارچه و یک‌شکل را در رابطه با زمان (مقایسه روزهای ۳۰ و ۶۰) نشان نداد از این‌رو مطالعات بیشتری در زمینه واکسیناسیون و چالش برای نشان دادن ارتباط میان مدت زمان واکسیناسیون و تغییرات آنزیم‌های گوارشی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از رساله دوره دکترا رشته شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه و حمایت‌های مالی مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران و اهواز و همچنین دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که امکانات این پژوهش را فراهم آوردند تشکر می‌گردد.

منابع

- Abdel-Tawwab, M., Monier, M. N., Abdelrhman, A. M., Dawood, M. A. O., 2020. Effect of dietary multi-stimulants blend supplementation on performance, digestive enzymes, and antioxidants biomarkers of common carp, *Cyprinus carpio* L. and its resistance to ammonia toxicity. *Aquaculture*, 528: 735529.
- Agnew, W. and Barnes, A. C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary microbiology*, 122: 0378-1135.
- Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N. and Faggio, C., 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture*, 507: 341–348.
- Akbary, P. and Shahraki, N., 2019. Effect of dietary supplementation of *Padina australis* (Hauk) extract on biochemical response and digestive enzyme activities of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4): 2118-2127.
- Akbary, P., Molazaei, E. and Aminikhoei, Z., 2018. Effect of dietary supplementation of *Ulva rigida* C. Agardh extract on several of physiological parameters of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 4: 59-68.

- Assan, D., Kuebutornye, F. K. A., Hlordzi, V., Chen, H., Mraz, J., Mustapha, U. F. and Abarike, E. D., 2022.** Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 257: 110653.
- Baiano, J. C. F. and Barnes, A. C., 2009.** Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 1891-1896.
- Bernfeld, P., 1951.** Amylases α and β . In *methods in enzymology*, vol.1 (Colowick, P & Kaplan, N.O., eds), pp: 149-157. New York: Academic press.
- Bradford, M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.
- Cabello, F. C., 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: growing problem for human and anemia health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8: 1137-1144.
- Calhau, C., Martel, F., Hipólito-Reis, C. and Azevedo, I., 2000.** Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clinical Biochemistry*, 33: 571-577.
- Corring, T., 1980.** The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. *Reproduction Nutrition Development*, 20: 1217-1235.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95: 271-278.
- Evensen, Ø., 2016.** Development of fish vaccines: focussing on methods. In: Adams A, Ed., *Fish Vaccines*, Springer International Publishing AG, Basel, 53-74.
- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M. H., Ross, N., Opstad, I. and Torrissen, O. J., 2000.** Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184: 303-314.
- Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., Ng, M. L., Jones, J. B., Nicholls, P. K. and Ferguson, H. W., 2012.** The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. *Journal of Fish Diseases*, 35 (1): 19-27.
- Glencross, B., 2006.** The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer*—a review. *Aquaculture Nutrition*, 12: 291-309.
- Halimi, M., Alishahi, M., Abbaspour, M. R., Ghorbanpoor, M. and Tabandeh, M. R., 2020.** High efficacy and economical procedure of oral vaccination against *Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 99: 505-513.
- Heydari, M., Firouzabakhsh, F. and Paknejad, H., 2020.** Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against yersiniosis in rainbow trout. *Aquaculture*, 515: 734586.
- Huang, Z., Ye, Y., Xu, A. and Wang, Z., 2021.** Dietary supplementation with an acidifier blend (citric, lactic, and phosphoric acids) influences growth, digestive enzymes, and blood chemistry of juvenile Japanese sea-bass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture International*, <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00703-8>
- Jang, W. J., Lee, J. M., Hasan, M. T., Lee, B. J., Lim, S. G., and Kong, I. S., 2019.** Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and shellfish immunology*, 92: 719-727.
- Jerry, D. R., 2013.** *Biology and Culture of Asian Seabass Lates Calcarifer*, CRC Press.
- Ji, Q., Wang, S., Ma, J. and Liu, Q., 2020.** A review: Progress in the development of fish *Vibrio* spp. Vaccines. *Immunology Letters*, 226: 0165-2478.
- Jiang, J. H., Masato, M. and Candy, C., 2014.** Differential Transcriptomic Response in the Spleen and Head Kidney Following Vaccination and Infection of Asian Seabass with *Streptococcus iniae*. *PLoS ONE*, 9: 99128.
- Juha, K., Riitta, R., Marja, P. and Heikki, K., 2004.** Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake, growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture*, 234: 41-50.
- Katavić, I., 2017.** "Challenges facing marine aquaculture in the EU-Mediterranean," in *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*, ed. B. Panagiotis, (Sharjah: Bentham Science Publishers), 42-84.

- Kayansamruaj, P., Areechon, N. and Unajak, S., 2020. Development of fish vaccine in Southeast Asia: A challenge for the sustainability of SE Asia aquaculture. *Fish and shellfish immunology*, 103: 73-87.
- Khang, P. V., Nha, V. V. and Nguyen, N. H., 2019. Resistance to *Streptococcus iniae* and its genetic associations with traits of economic importance in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Diseases*, 42: 1657-1666.
- Krogdahl, Å. and Marie Bakke-McKellep, A., 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141: 450-460.
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Luk, W., Fung, A. M. Y., Hui, W., Fong, A. H. C. and Yuen, K., 2006. Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and b-hemolytic than those from North America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54: 177-181.
- Miccoli, A., Saraceni, P. R. and Scapigliati, G., 2019. Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish and Shellfish Immunology*, 94: 800-809.
- Midhun, S. J., Arun, D., Edatt, L., Sruthi, M. V., Thushara, V. V., Oommen, O. V., Sameer Kumar, V. B. and Divya, L., 2016. Modulation of digestive enzymes, GH, IGF-1 and IGF-2 genes in the teleost, Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by dietary curcumin. *Aquaculture International*, 24(5): 1277-1286.
- Mohamad, N., Azmai Amal, M. N., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S. and Sawabe, T., 2019. Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512: 734289.
- Mohammadi, Y., Mesbah, M., Chelema Dezfoulnejad, M., Shamsaie Mehrgan, M. and Rajabi Islami, H. 2021. Growth performance, blood biochemical parameters, immune response, and antioxidant defense of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fingerlings exposed to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. *Aquaculture international*, 29: 2751-2767.
- Mohammadian, T., Ghanei-Motlagh, R., Jalali, M., Nasirpour, M., Mohtashamipour, H., Osroush, E. and Nejad, A. J., 2021. Protective effects of non-encapsulated and microencapsulated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to lead (Pb) via diet. *Annals of Animal Science*, <http://dx.doi.org/10.2478/aoas-2021-0026>
- Mohammadian, T., Nasipour, M., Tabandeh, M. R., Heidary, A. A., Ghanei-Motlagh, R. and Hosseini, S. S., 2019. Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 86: 269-279.
- Nakanishi, T., 2020. Preface - Development and use of vaccines for fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 106: 218.
- Nho, S. W., Hikima, J., Park, S. B., Jang, H. B., Cha, I. S., Yasuike, M., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Sano, M., Kanai, K., Kondo, H., Hirano, I., Takeyama, H., Aoki, T. and Jung, T. S., 2013. Comparative genomic characterization of three *Streptococcus parauberis* strains in fish pathogen, as assessed by wide-genome analyses. *PLoS One*, 8: 80395.
- Norhariani, M. N., Siti-Hajar, M. Y., Hassan, M. D., Amal, M. N. A. and Nurliyana, M., 2019. Costs of management practices of Asian seabass cage culture in Malaysia using stochastic model that includes uncertainty in mortality. *Aquaculture*, 510: 347-352.
- Nya, E. J and Austin, B., 2011. Dietary modulation of digestive enzymes by the administration of feed additives to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum. *Aquaculture Nutrition*, 17: 459-466.
- Osman, K. M., Al-Maary, K. S., Mubarak, A. S., Dawoud, T. M., Moussa, I. M. I., Ibrahim, M. D. S., Hessain, A. M., Orabi, A. and Fawzy, N. M., 2018. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Veterinary Research*, 13: 357.
- Piamsomboon, P., Thanasaksiri, K., Murakami, A., Fukuda, K., Takano, R., Jantrakajorn, S. and Wongtavatchai, J., 2020. Streptococcosis in freshwater farmed seabass *Lates calcarifer* and its virulence in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 523: 735189.

- Reyshari, A., Mohammadiarzarm, H., Mohammadian, T. and Torfi Mozanzadeh, M., 2019.** Effects of sodium diformate on growth performance, gut microflora, digestive enzymes and innate immunological parameters of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 25: 1135-1144.
- Romero, J., Feijoó, C. G. and Navarrete, P., 2012.** Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. In: Carvalho ED, David GS, Silva RJ (eds) *Health and Environment in Aquaculture*, Tech Open Science, Rijeka, Croatia, pp 159-198.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S. A., Jensen, H. B., Opstvedt, J., Nygård, E., Samuelsen, T. A., Mundheim, H. and Luzzana, U., 2002.** In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 644-654.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Sunde, J., Berg, A. E., Nordgarden, U., Fjellidal, P. G. and Oppedal, F. 2009.** Digestive efficiency, free amino acid pools and quality of growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by light regimes and vaccine types. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 255-72.
- Sotoudeh, E., Sangari, M., Bagheri, D., Morammazi, S. and Torfi Mozanzadeh, M., 2020.** Dietary organic acid salts mitigate plant protein induced inflammatory response and improve humoral immunity, antioxidative status and digestive enzyme activities in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture Nutrition*, 00: 1-12.
- Tan, L. N., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W. D., Hu, K., Li, S. H. and Zhou, X. Q., 2011.** Growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary zinc. *Aquaculture Nutrition*, 17: 338-345.
- Thu Lan, N. G., Salin, K. R., Longyant, S., Senapin, S. and Dong, H. T., 2021.** Systemic and mucosal antibody response of freshwater cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 108: 7-13.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671.
- Vi, H. T., Quyen, V. D. H., Dung, N. H. and Wergeland, H. I., 2013.** Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *International Journal of Aquatic Science*, 4(1): 3-12.
- Wang, Q., Fu, T., Li, X., Luo, Q., Huang, J., Sun, Y. and Wang, X. 2019.** Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccines. *Fish and Shellfish Immunology*, 97: 382-389.
- Wang, Q., Ji, W. and Xu, Z., 2020.** Current use and development of fish vaccines in China. *Fish and Shellfish Immunology*, 96: 223-234.
- Worthington, C. C., 1991.** Manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold, New Jerse, pp: 80-85.
- Yue, G. and Li, Y. L., 2001.** Orban Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology*, 3: 1-3.
- Zemheri-Navruz, F., Acar, U. and Yilmaz, S., 2020.** Dietary supplementation of olive leaf extract enhances growth performance, digestive enzyme activity and growth related genes expression in common carp *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology*, 296: 113541.
- Zhou, L., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks M. S. and Dave, D., 2011.** Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin: A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7 (3): 104-123.

اثر واکسن‌های تک‌واحدی و دوگانه علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*) و ... / محمدی و همکاران