



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره چهارم، شماره دوم، تابستان ۹۵

<http://jair.gonbad.ac.ir>

اثر پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* بر شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه، خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی سورم طلایی *Heros severus* Heckel, 1840

طاهره باقری^۱، حامد غفاری فارسانی^{۲*}

^۱ دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۲ دانشجوی دکتری شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ ارسال: ۹۵/۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، بهره‌وری غذایی، خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی دستگاه گوارش ماهی سورم انجام شد. در این آزمایش تعداد ۱۲۰ عدد ماهی سورم (*H. severus*) با میانگین وزن اولیه $18/72 \pm 0/3$ گرم در ۴ تیمار شامل جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* (0 ، $1/5 \times 10^8$ ، 3×10^8 و 6×10^8 CFU/g) و هر تیمار با سه با تکرار به مدت ۶۰ روز مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان آزمایش شاخص‌های یادشده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در جیره به شکل معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث بهبود پارامترهای رشد و ضریب تبدیل غذایی شد. نتایج سنجش آنزیم‌های گوارشی نشان داد که افزودن *L. acidophilus* به جیره باعث افزایش معنادار ($p < 0/05$) فعالیت اختصاصی آنزیم‌های گوارشی روده شامل لیپاز، آلفا آمیلاز، پروتئاز و فسفاتاز قلیایی ماهیان سورم شد. همچنین تغذیه ماهیان سورم با این پروبیوتیک باعث تغییر شاخص‌های خون‌شناسی شد به شکلی که ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی پروبیوتیک دارای سطح بالاتری از میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز و سفید بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک *L. acidophilus* در سطوح $1/5 \times 10^8$ ، 3×10^8 و 6×10^8 CFU/g در جیره غذایی باعث بهبود شاخص‌های رشد و فراسنجه‌های فیزیولوژیکی ماهی سورم شد و سطح 3×10^8 دارای بیشترین اثر بود.

واژگان کلیدی: *L. acidophilus*، *H. severus*، آنزیم‌های گوارشی، خون‌شناسی

*مسئول مکاتبه: hamed_ghafarifarsani@yahoo.com

مقدمه

در پرورش ماهیان زینتی حفظ کیفیت ظاهری و همچنین بهبود رشد به دنبال تغذیه بهینه و همچنین کاهش هزینه‌های جاری تأمین جیره غذایی مناسب از مسائل اصلی کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان زینتی به‌شمار می‌رود. در تکثیر و پرورش آبزیان جهت بهبود و افزایش سرعت رشد ماهیان و همچنین بهبود کیفیت سلامت و کاهش تلفات در دوره‌های مختلف زندگی آن‌ها، به‌خصوص در مورد بچه ماهیان که حساسیت بالاتری دارند و همچنین کاهش هزینه‌های مربوط به تأمین جیره غذایی راهبردهای مختلفی به کار گرفته شده است (Goddard, 1995). مطالعات در زمینه تغذیه آبزیان و مکمل‌های غذایی به خوبی نشان داده‌اند که از طریق بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش به‌وسیله افزودن مکمل‌ها از جمله پروبیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها می‌توان باعث بهبود هضم، جذب و در نهایت بهبود رشد شد (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Ringø *et al.*, 2014; Nwanna, 2015).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش می‌توانند برای سلامتی میزبان مفید باشند. پروبیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند جنبه‌های مختلف فیزیولوژی میزبان خود را تحت تأثیر قرار دهند. در رابطه با تأثیر پروبیوتیک‌ها می‌توان به عملکرد این باکتری‌های مفید در دفع رقابتی و جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده رشد یا رقابت برای غذا و مکان اشاره نمود. همچنین تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان از دیگر کارکردهای مفید پروبیوتیک‌ها برشمرد (Nayak, 2010; Balcázar *et al.*, 2006). پروبیوتیک‌ها از طریق بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی و همچنین با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب افزایش رشد می‌گردند (Austin, 2002; Ringø *et al.*, 2014). پروبیوتیک‌ها می‌توانند به صورت مستقیم یا غیرمستقیم بر آبزیان تأثیر بگذارند. در حالت اول با تغییر تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش آبی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شوند (Hoseinifar *et al.*, 2015; Butel, 2014). در حالت دوم با بهبود کیفیت آب و محیط‌زیست آبی باعث کاهش استرس می‌شوند که خود موجب کاهش احتمال بروز بیماری‌ها می‌شود، چرا که بین مقاومت میزبان، عوامل بیماری‌زا و محیط پرورش رابطه‌های سه گانه برقرار است که هر یک دیگری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Zokaeifar *et al.*, 2014).

باکتری‌های پروبیوتیکی و مواد تولید شده توسط این باکتری‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم فلور میکروبی دستگاه گوارش، مکانیسم‌های دفاعی، سیستم گوارش و همچنین هضم و جذب مواد غذایی و در نهایت ضریب تبدیل غذایی و پارامترهای رشد ماهیان را تحت تأثیر قرار دهند (Nayak, 2010; Ringø and Gatesoupe, 1998; Bricknell and Dalmo, 2005). پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش با

استفاده از مواد غذایی غیر قابل‌هضم و تخمیر این مواد باعث بهبود هضم و جذب مواد غذایی و افزایش رشد می‌شوند (Rossi et al., 2005). همچنین فاکتورهای هماتولوژی به عنوان یکی از شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیک و ایمنی اولیه ماهیان شناخته شده‌اند که به شدت تحت تأثیر تغییر رژیم غذایی و حضور مکمل‌های میکروبی در جیره می‌باشد (Yar-Ahmadi et al., 2014). در مطالعه‌ای که قبلاً روی پروبیوتیک *L. acidophilus* انجام شد، مشخص گردید که افزودن سطوح مختلف آن به جیره ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی و همچنین افزایش رشد شد (Lara-Flores et al., 2003). همچنین افزودن پروبیوتیک *L. acidophilus* به جیره گربه‌ماهی آفریقای (*Clarias gariepinus*) باعث افزایش سطح هماتوکریت، هموگلوبین و همچنین تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید این آبی شد (Al-Dohail et al., 2009). استفاده از پروبیوتیک *L. acidophilus* در جیره غذایی ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) به شکل معنی‌داری باعث بهبود پارامترهای شاخص رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی شد (Hoseinifar et al., 2015). اگرچه مطالعات نسبتاً خوبی در مورد اثر باکتری‌های پروبیوتیکی مختلف بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک طیف گسترده‌ای از ماهیان انجام شده است (Lara-Flores, 2011; Martínez Cruz et al., 2012) ولی در زمینه تأثیر این پروبیوتیک‌ها به‌ویژه *L. acidophilus* در ماهیان زینتی مطالعات کمتری انجام شده است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* جیره غذایی بر عملکرد رشد و بهره‌وری غذایی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای خون‌شناسی ماهی سورم است.

مواد و روش

این آزمایش در ۱۲ عدد آکواریوم مجزا با ظرفیت ۶۰ لیتر انجام شد. هر آکواریوم توسط یک سنگ هوا که به پمپ هوای مرکزی متصل بود هوادهی می‌شد. آکواریوم‌ها با آب فاقد کلر آبگیری شدند و تعداد ۱۰ عدد بچه‌ماهی در هر آکواریوم ذخیره‌سازی شد. این آزمایش در ۴ تیمار و ۳ تکرار بر روی ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی سورم (*H. severus*) با میانگین وزن اولیه $18/72 \pm 0/3$ گرم و به مدت ۶۰ روز انجام پذیرفت. ماهیان سالم از لحاظ ظاهری ۱۴ روز قبل به‌منظور سازگاری با شرایط و همچنین واحدهای آزمایشی از سالن مرکزی کارگاه به اتاق آزمایش منتقل شدند. طی دوران سازگاری بچه‌ماهیان با جیره تجاری شرکت بیومار (Biomar) بدون مکمل غذایی بر اساس ۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. غذای مشخص‌شده برای ماهیان طی ۳ مرتبه در روز در اختیار آن‌ها قرار گرفت. پس از دوره سازگاری، در طول دوره آزمایش شرایط دوره نوری بر اساس ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم شد و همچنین بچه‌ماهیان در دوره پرورش به میزان ۵ درصد وزن بدن با جیره‌های

آماده‌شده تغذیه شدند. طی دوره آزمایش پارامترهای فیزیک و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شدند. به طوری که دمای آب 28.5 ± 0.7 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول 6.12 ± 1.08 میلی‌گرم در لیتر، pH برابر 7.6 ± 0.6 و آمونیاک برابر 0.023 ± 0.007 میلی‌گرم در لیتر بود. جهت نگهداری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در سطوح ذکر شده علاوه بر اعمال هوادهی، روزانه به میزان ۳۰ درصد از حجم آب هر آکواریوم از کف سیفون و با آب تازه کلرزدایی شده جایگزین شد.

آماده‌سازی غذا و غذادهی: پروبیوتیک *L. acidophilus* (PTCC 1643) به صورت لیوفیلیزه (انجماد خشک) از شرکت تک ژن زیست تهیه شد. پس از رقیق‌سازی با آب پیتونه، باکتری به صورت خطی در محیط کشت MRS (Merck, Germany) کشت داده شد. باکتری‌ها به لوله‌آزمایش حاوی محیط کشت مایع عمومی براث (Soy broth) تزریق و تا رسیدن به غلظت مناسب در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. غلظت‌های صفر (گروه ۱)، $1/5 \times 10^8$ (گروه ۲) و 3×10^8 (گروه ۳) و 6×10^8 (گروه ۴) CFU/g با قرائت نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و به غذای تجاری (جدول ۱) اضافه و در ظروف در بسته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این آزمایش جهت تغذیه ماهیان از غذای تجاری شرکت بیومار فرانسه (BioMar®) استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره پایه در آزمایش بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* بر ماهی سورم (*H. severus*)

ترکیب غذایی	مقدار
پروتئین (/.)	۴۸/۳
چربی (/.)	۱۴/۷
فیبر (/.)	۰/۵-۰/۳
خاکستر (/.)	۹/۴
انرژی قابل هضم	۴۶۵۰ (MJ/kg)
انرژی خام	۵۲۲۶ (MJ/kg)

پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی: در طول دوره آزمایش جهت محاسبه میزان صحیح غذای مورد نیاز هر مخزن و همچنین محاسبه پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی در فواصل زمانی هر دو هفته یکبار زیست‌سنجی ماهیان انجام شد. در هر دوره زیست‌سنجی، فاکتورهای طول کل و همچنین وزن کل ماهیان توسط خط‌کش مدرج و ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. سایر پارامترهای رشد از جمله درصد افزایش وزن (WG%)، شاخص رشد ویژه (SGR)، شاخص وضعیت

(CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و همچنین نسبت کارایی پروتئین (PER) و در نهایت میزان بقای بچه ماهیان بر اساس روابط مربوطه محاسبه شد.

سنجش آنزیم‌های گوارشی: جهت سنجش آنزیم‌های گوارشی در پایان دوره آزمایش ماهیان ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع غذادهی شدند تا دستگاه گوارش آن‌ها از مواد غذایی کاملاً تخلیه شود. سپس تعداد سه عدد ماهی از هر تکرار به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب شدند و توسط عصاره گل میخک با دز بالا (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) آسان‌کشی و در مجاورت یخ قرار داده شدند تا به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی کالبدگشایی آن‌ها صورت گیرد. سپس مجرای گوارشی ماهیان از ابتدا تا انتها از سایر قسمت‌ها جداسازی شد و مجرای گوارشی جداسازی شده از ماهی‌های جداگانه با آب مقطر خنک شستشو داده شدند و در مخزن ازت مایع سریع منجمد شده سپس تا زمان استفاده جهت سنجش آنزیم‌های موردنظر در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی نمونه‌ها در دمای اتاق انجمادزدایی شدند و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ توزین شدند. به‌منظور جداسازی عصاره حاوی آنزیم‌های گوارشی و سنجش آنزیم‌های مورد نظر، مجرای گوارشی هر ماهی درون یک لوله فالتون که قبلاً استریل شده بودند قرار داده شدند و به نسبت وزنی به حجمی (W/V) ۵ برابر (۱/۵) به آن‌ها محلول نمکی (کلرید سدیم) ۰/۲ مولار اضافه شد. سپس توسط یک دستگاه یکنواخت‌کننده (هموژنایزر) (IKA T25 digital, Ultra Turrax model) به‌خوبی یکنواخت شدند. جهت جداسازی عصاره‌های خام حاوی آنزیم‌های گوارشی مخلوط‌های یکنواخت شده در سانتریفیوژ (Eppendorf 5810R) با دور ۱۰۰۰۰ g در دمای ۴ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس مایع بالایی جهت سنجش آنزیم‌های گوارشی جداسازی و به تیوپ‌های تمیز انتقال داده شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- نگهداری شدند (Yanbo and Zirong, 2006).

سنجش آنزیم‌های گوارشی: سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در دستگاه گوارش بر اساس روش Worthington انجام شد. در این روش میزان فعالیت آنزیم لیپاز بر اساس میزان آزادسازی اسیدهای چرب حاصل از هیدرولیز تری‌گلیسیرید مورد ارزیابی قرار گرفت (Worthington, 1988). فعالیت آنزیم آمیلاز دستگاه گوارش بر اساس روش Bernfeld مورد سنجش قرار گرفت. در این روش از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده شد و جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد (Bernfeld, 1955). نشاسته در بافر فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار حاوی کلرید سدیم ۰/۰۰۶ مولار آماده شد. یک واحد فعالیت اختصاصی آنزیم آلفا-آمیلاز (U) معادل یک میکرومول مالتوز آزاد شده در مدت ۱ دقیقه و به ازای یک میلی‌گرم پروتئین محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تعریف شد.

فعالیت آنزیمی پروتئاز کل بر اساس هیدرولیز کازئین به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. در این روش مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۱٪ (وزنی/حجمی) کازئین در آب (۰/۲۵ میلی‌لیتر)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر بافر و ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه آنزیمی بود که به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

انکوبه شدند. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۰/۶ میلی‌لیتر از ۸٪ (وزنی/حجمی) تری‌کلر استیک اسید متوقف شد و پس از نگهداری به مدت یک ساعت در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و قسمت بالایی جداسازی و جهت سنجش آنزیم میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. در این روش تیروزین به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Hidalgo et al., 1999).

میزان فسفاتاز قلیایی دستگاه گوارش بر اساس روش توضیح داده شده اندازه‌گیری شد (Villanueva et al., 1997). در این روش از p-nitrophenyl phosphate به‌عنوان سوبسترا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد. فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مدت ۶ دقیقه خوانده شد. سرانجام فعالیت لیپاز، پروتئاز و آمیلاز بر اساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت در دقیقه ($U\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$) بیان شد و میزان فسفاتاز قلیایی بر اساس میزان آنزیمی که ۱ ماکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه هیدرولیز می‌کند بیان گردید.

فراسنجه‌های خون‌شناسی: در پایان دوره آزمایش جهت سنجش پارامترهای خون‌شناسی تعداد ۴ عدد ماهی از هر تکرار به شکل تصادفی انتخاب شد، جهت جلوگیری از بروز استرس، ماهیان ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع غذا شدند و در زمان خون‌گیری توسط پودر گل میخک با دز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند. خون‌گیری توسط قطع ساقه دمی و جمع‌آوری توسط لوله‌های موئین همتوکریت انجام شد و به تیوپ‌های هپارینه برای سنجش فاکتورهای خون‌شناسی انتقال یافت.

فاکتورهای خون‌شناسی مورد مطالعه در این آزمایش شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، همتوکریت (Hct)، هموگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بود. تعداد کل گلبول‌های سفید (WBC) و گلبول‌های قرمز (RBC) از طریق لایم نتوبار توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ پس از رقیق‌سازی خون توسط بافر فسفات نمکی شمارش شدند. برای اندازه‌گیری همتوکریت (Hct) از لوله‌های موئین همتوکریت و دستگاه سانتریفیوژ همتوکریت استفاده شد. میزان هموگلوبین (Hb) از طریق روش سیانوهموگلوبین موردسنجش قرار گرفت. میزان حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Asadi et al., 2016).

$$MCV = \frac{Hct * 1000}{RBC(10^6\ mm^{-3})}$$

$$MCH = \frac{Hb(gdl^{-1})}{RBC(10^6\ mm^{-3})}$$

$$MCHC = \frac{Hb(gdl^{-1})}{Hct}$$

نتایج

تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* بر پارامترهای رشد و ضریب تبدیل غذایی ماهی سورم در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی به روشنی نشان می‌دهد که گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی سطح 3×10^8 CFU/g از *L. acidophilus* در هر کیلوگرم جیره دارای بیشترین وزن نهایی، درصد افزایش وزن و شاخص رشد روزانه بودند ($p < 0.05$). همچنین وزن نهایی، درصد افزایش وزن و شاخص رشد روزانه در گروه تغذیه‌شده با سطوح 1.5×10^8 و 6×10^8 در مقایسه با گروه کنترل در سطح بالاتری قرار داشت ($p < 0.05$). ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین گروه تغذیه‌شده با سطح 3×10^8 در پایین‌ترین سطح قرار داشتند ($p < 0.05$) و همچنین مقدار ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین در گروه تغذیه‌شده با سطوح 1.5×10^8 و 6×10^8 در مقایسه با گروه کنترل در کمتر بود ($p < 0.05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و بهره‌وری غذایی ماهی سورم (*H. severus*) در تیمارها با سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus*

سطوح مختلف پروبیوتیک <i>L. acidophilus</i> (CFU/g)				
6×10^8	3×10^8	1.5×10^8	.	
18.68 ± 0.27	18.71 ± 0.39	18.71 ± 0.25	18.78 ± 0.34	وزن اولیه (گرم)
33.91 ± 0.64^b	37.35 ± 0.58^a	34.39 ± 0.34^b	28.40 ± 0.64^c	وزن نهایی (گرم)
81.53 ± 4.93^b	99.64 ± 1.41^a	83.77 ± 8.12^b	51.19 ± 1.12^c	WG(%)
0.43 ± 0.02^b	0.50 ± 0.01^a	0.44 ± 0.03^b	0.30 ± 0.01^c	SGR(%)
2.08 ± 0.09^b	1.80 ± 0.02^c	2.04 ± 0.14^b	2.94 ± 0.05^a	FCR
0.95 ± 0.04^b	0.83 ± 0.01^c	0.94 ± 0.06^b	1.35 ± 0.02^a	PER

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشانگر تفاوت‌های آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$).

تأثیر سطوح مختلف *L. acidophilus* بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۳ آمده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم لیپاز در گروه ۳ و ۴ در مقایسه با گروه کنترل و گروه ۱ به شکل معنی‌داری در سطح بالاتری قرار داشت ($p < 0.05$). فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز همه گروه‌های تغذیه‌شده با *L. acidophilus* (گروه ۲، ۳ و ۴) در مقایسه با گروه کنترل به شکل معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که پروبیوتیک *L. acidophilus* باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم پروتئاز دستگاه گوارش شده است به شکلی که در گروه ۳ و ۴ سطح فعالیت آنزیم پروتئاز در مقایسه با سایر گروه‌ها به شکل معنی‌داری افزایش یافته بود ($p < 0.05$). فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی گروه ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به شکل معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.05$).

جدول ۳- مقایسه آنزیم‌های گوارشی روده ماهی سورم (*H. severus*) در تیمارها با سطوح مختلف *L. acidophilus*

سطوح مختلف پروبیوتیک <i>L. acidophilus</i> (CFU/g)				
6×10^4	3×10^4	$1/5 \times 10^4$	.	
$3/92 \pm 0.07^a$	$3/81 \pm 0.16^a$	$3/13 \pm 0.21^b$	$3/07 \pm 0.15^b$	لیپاز (U)
$7/26 \pm 0.36^{ab}$	$7/14 \pm 0.28^a$	$6/60 \pm 0.27^a$	$5/79 \pm 0.55^b$	آلفا آمیلاز (U)
$345/0 \pm 10/8^b$	$401/7 \pm 16/2^a$	$311/3 \pm 4/0^c$	$298/0 \pm 3/6^c$	پروتئاز (U)
$1/39 \pm 0.10^{ab}$	$1/52 \pm 0.14^a$	$1/24 \pm 0.16^b$	$1/21 \pm 0.06^b$	فسفاتاز قلیایی (U)

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشانگر تفاوت‌های آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$).

تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* بر برخی فراسنجه‌های خون‌شناسی ماهی سورم در جدول ۴ ارائه شده‌اند. نتایج نشان داد که سطوح مختلف *L. acidophilus* تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی سورم داشته است. همچنین تعداد کل گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید در گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک *L. acidophilus* در مقایسه با گروه کنترل به شکل معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.05$). میزان هماتوکریت و همچنین هموگلوبین گروه‌های ۳ و ۴ در مقایسه با سایر گروه‌ها به شکل معنی‌داری افزایش یافته بود ($p < 0.05$). میزان MCH در گروه ۳ و ۴ در مقایسه با سایر گروه‌ها در سطح پایین‌تری قرار داشت و همچنین میزان MCV در همه گروه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک *L. acidophilus* در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود ($p < 0.05$). میزان MCHC در بین گروه‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار نبود.

جدول ۴- فاکتورهای خون‌شناسی ماهی سورم (*H. severus*) در تیمارها با سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus*

سطوح مختلف پروبیوتیک <i>L. acidophilus</i> (CFU/g)				
6×10^4	3×10^4	$1/5 \times 10^4$	.	
$1/7 \pm 0.05^b$	$1/95 \pm 0.08^a$	$1/58 \pm 0.16^b$	$1/34 \pm 0.08^c$	تعداد گلبول قرمز
$2/2 \pm 0.03^b$	$2/2 \pm 0.06^a$	$1/9 \pm 0.06^b$	$1/7 \pm 0.03^c$	تعداد گلبول سفید
$30/01 \pm 0.35^b$	$31/80 \pm 0.36^a$	$29/23 \pm 0.40^c$	$28/83 \pm 0.55^c$	هماتوکریت
$8/47 \pm 0.25^b$	$9/00 \pm 0.36^a$	$8/27 \pm 0.20^{cb}$	$7/8 \pm 0.26^c$	هموگلوبین
0.05 ± 0.003^b	0.05 ± 0.003^b	0.05 ± 0.004^b	0.06 ± 0.005^a	MCH
0.017 ± 0.002^b	0.016 ± 0.001^b	0.018 ± 0.002^{ab}	0.021 ± 0.002^a	MCV
$28/08 \pm 1/16^a$	$28/30 \pm 0.88^a$	$28/28 \pm 0.67^a$	$27/05 \pm 0.48^a$	MCHC

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشانگر تفاوت‌های آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی بخشی از فعالیت‌های آبی‌پروری است که تحت تأثیر وضعیت ظاهری و اندازه آبی هدف به‌عنوان دو فاکتور اصلی در مورد انتخاب ماهیان آکواریومی می‌باشد. استفاده از مکمل‌های غذایی جهت بهبود سلامت و ظاهر ماهی و همچنین بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای به‌منظور تسریع در فرایند رشد و کوتاه نمودن زمان ارائه به بازار می‌تواند به کاهش هزینه‌های جاری کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان زینتی کمک کند. استفاده از پری‌بیوتیک و پروبیوتیک در جیره آبزیان باعث بهبود رشد و بهره‌وری غذایی گونه‌ها مختلف آبزیان شده است (Merrifield et al., 2010; Ringø et al., 2010). بیشتر اطلاعات در زمینه استفاده از مکمل‌های غذایی پرو/پری‌بیوتیکی در مورد آزادماهیان و سایر ماهیان پرورشی اقتصادی است (Merrifield et al., 2010) و در این میان اطلاعات کمتری در مورد اثر انواع مکمل‌های پروبیوتیکی بر روی پارامترهای رشد، خون‌شناسی و فیزیولوژی گونه‌های مختلف ماهیان زینتی وجود دارد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی $10^8 \times 1/5$ و $10^8 \times 3$ و $10^8 \times 6$ CFU/ml پروبیوتیک *L. acidophilus* در هر کیلوگرم جیره (گروه ۲، ۳ و ۴)، در مقایسه با گروه شاهد بهبود بهره‌وری غذایی و همچنین افزایش پارامترهای رشد را نشان دادند. هم‌راستا با نتایج حاصل از این مطالعه در مطالعاتی دیگر که روی ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) انجام گرفت مشخص شد که استفاده از پروبیوتیک *L. acidophilus* در جیره به شکل معنی‌داری باعث بهبود پارامترهای شاخص رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی شد (Hoseinifar et al., 2015). نتایج مطالعاتی مشابه که با هدف بررسی اثر پروبیوتیک *L. acidophilus* بر پارامترهای رشد و بهره‌وری غذا در گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) انجام شد نشان داد که جیره پایه حاوی $10^7 \times 3/01$ CFU در هر گرم غذا به شکل معنی‌داری باعث بهبود پارامترهای رشد، ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین شد (Al-Dohail et al., 2009). در مطالعه دیگری روی ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) مشخص شد که افزودن پروبیوتیک *L. acidophilus* به جیره به شکل معنی‌داری باعث افزایش رشد این ماهی شد (Aly et al., 2008). افزودن ترکیبات پروبیوتیکی به جیره ماهی باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش میزبان به سمت باکتری‌های تخمیرکننده (باکتری پروبیوتیکی موردنظر) می‌شوند که این جایگزینی باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش میزبان به‌دلیل رقابت برای محل استقرار و غذا بوده و باعث کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش و کاهش صرف انرژی جهت مقابله میزبان با باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش احتمال ابتلا به بیماری می‌شود (Hoseinifar et al., 2015; Moriarty, 1998). مطالعات گذشته به‌خوبی نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های پروبیوتیکی دارای توانایی ترشح آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش میزبان هستند و

باعث بهبود فرایند هضم و جذب مواد غذایی و در نتیجه افزایش رشد میزبان می‌شوند (Yanbo and Ziron, 2006; Suzer et al., 2008). از دیگر ساز و کارهای اثرگذاری مطلوب پروبیوتیک‌ها از جمله باسیلوس‌ها، بیفیدوباکتریوم‌ها و حتی گونه انتروکوکوس تولید و ترشح انواع ویتامین‌ها، استات و لاکتات است. این مواد از طریق جریان خون به کبد انتقال داده‌شده و با به مصرف رسیدن به‌عنوان مواد غذایی توسط میزبان باعث بهبود رشد می‌شوند (Gunal et al., 2006).

فعالیت آنزیم‌های گوارشی به‌عنوان یکی از شاخص گوارشی مهم و بیان‌کننده وضعیت تغذیه‌ای ماهیان است (Hidalgo et al., 1999). هرگونه تغییر در جیره غذایی ماهیان باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی موجود می‌شود (Kawai and Ikeda, 1972). نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن پروبیوتیک *L. acidophilus* به جیره غذایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی از جمله لیپاز، پروتئاز، آمیلاز و فسفاتاز قلیایی شد. در این راستا مطالعات گذشته نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های غذایی میکروبی به شکل مؤثری باعث بهبود فعالیت اختصاصی آنزیم‌های گوارشی گونه‌های مختلف آبزیان می‌شوند. اضافه کردن باکتری‌های فتوسنتز کننده و *Bacillus sp.* در جیره غذایی کپور معمولی (*cyprinus carpio*) (Yanbo and Ziron, 2006) و همچنین افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus spp* در جیره غذایی لارو گونه باس دریایی (*Sparus aurata, L.*) (Yanbo and Ziron, 2006) باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی شد. پروبیوتیک‌ها به دو شیوه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی میزبان خود می‌شوند. یکی از این مکانیسم‌ها تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی میزبان است و مکانیسم دیگر از طریق افزایش سطح آنزیم‌های گوارشی خارجی که توسط فلور میکروبی دستگاه گوارش ترشح می‌شوند که احتمالاً به دنبال افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بهبود هضم و جذب مواد غذایی و در نتیجه کاهش چشم‌گیر ضریب تبدیل غذایی و بهبود رشد حاصل می‌شود (Moriarty, 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006).

فاکتورهای مختلفی از جمله وضعیت فیزیولوژیک، فاکتورهای محیطی، وضعیت استرس، شرایط تغذیه‌ای و نیز مکمل‌های غذایی از جمله محرک‌های سیستم ایمنی و مکمل‌های میکروبی فاکتورهای خون‌شناسی ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. با این حال اطلاعات محدودی در زمینه اثرات مکمل‌های غذایی میکروبی از جمله پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای خون‌شناسی ماهیان زینتی از جمله ماهی سورم در مقایسه با سایر ماهیان پرورشی تجاری وجود دارد. نتایج حاصل از بررسی‌های خون‌شناسی نشان دادند که جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک *L. acidophilus* به شکل معنی‌داری فراسنجه‌های خون‌شناسی مورد بررسی را در ماهیان سورم تحت تأثیر قرار داد. هم راستا با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، الدوحیل و همکاران (Al-Dohail et al., 2009) نشان دادند که اضافه کردن پروبیوتیک *L. acidophilus* به جیره گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) باعث افزایش

سطح همتوکریت، هموگلوبین و همچنین تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید شد. در مطالعه‌ای دیگر که روی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) صورت گرفت مشخص شد که با افزودن پروبیوتیک پروتکسین به جیره، همتوکریت، هموگلوبین و همچنین تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید ماهیان افزایش یافت، ولی با افزایش سطح پروبیوتیک تاثیر منفی و کاهش سطح این فاکتورها مشاهده شد (Firouzbakhsh et al., 2011). پارامترهای خون‌شناسی به‌عنوان شاخص‌های اولیه سیستم ایمنی گونه آبری و همچنین بیانگر وضعیت فیزیولوژیک موجود می‌باشند که افزایش سطح فاکتورهای خون‌شناسی مورد سنجش در این آزمایش می‌تواند به‌عنوان شاخصی جهت بهبود سیستم ایمنی ماهی سورم به دنبال تغذیه با جیره حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس باشد (Talas and Gulhan, 2009).

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از این مکمل غذایی میکروبی (3×10^8 CFU/g) دارای تأثیر مثبت بر شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه‌ای، خون‌شناسی و فعالیت آنزیمی بچه‌ماهیان سورم دارد. بررسی‌های بیشتر جهت درک مکانیسم‌های احتمالی دخیل در بروز این آثار، بررسی تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش و همچنین سنجش میزان متابولیت‌های حاصل از تخمیر باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان به دنبال مصرف پروبیوتیک *L. acidophilus* می‌تواند در بهبود سلامت و همچنین تهیه جیره‌های غذایی مناسب برای انواع ماهیان زینتی راه‌گشا باشد.

منابع

- Al-Dohail M.A., Hashim R., Aliyu-Paiko M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40: 1642-1652.
- Aly S.M., Ahmed Y.A.G., Ghareeb A.A.A., Mohamed M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- Asadi M., Mirvaghefi A., Nematollahi M., Banaee M., Ahmadi K. 2016. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Open Veterinary Journal*, 2: 32-39.
- Balcázar J.L., De Blas I. Ruiz-Zarzuela Cunningham D., Vendrell Múzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1: 149-158.
- Bricknell I., Dalmo R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 457-472.

- Butel M.J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44: 1-8.
- Martínez Cruz P., Ibáñez A.L., Monroy Hermosillo O.A., Ramírez Saad H.C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2: 1-13.
- Firouzbakhsh F., Noori F., Khalesi M.K., Jani-Khalili K. 2011. Effects of a probiotic, protein, on growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 833-842.
- Goddard S. 1995. Feed management in intensive aquaculture. Springer Science and Business Media. 194P.
- Gunal M., Yayli G., Kaya O., Karahan N., Sulak O. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 5: 149-155.
- Hidalgo M., Urea E., Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- Hoseinifar S.H., Roosta Z., Hajimoradloo A., Vakili F. 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and Shellfish Immunology*, 42: 533-538.
- Kawai S., Ikeda S. 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38: 265-270.
- Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzmán-Méndez B.Z.E., López-Madrid W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 193-201.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T., Bøgwald J., Castex M., Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- Moriarty D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
- Nayak S. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 2-14.
- Nwanna L. 2015. Use of probiotics in aquaculture. *Applied Tropical Agriculture*, 15: 76-83.
- Pérez-Sánchez T., Ruiz-Zarzuela I., Blas I., Balcázar J.L., 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6: 133-146.

- Ringø E., Dimitroglou A., Hosseini S.H., Davies S.J. 2014. Prebiotics in Finfish: an update. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 1(14): 360-400.
- Ringø E., Gatesoupe F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Ringø E., Olsen R., Gifstad T., Dalmo R., Amlund H., Hemre G.I., Bakke A. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16: 117-136.
- Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanon S., Matteuzzi D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6150-6158.
- Suzer C., Çoban D., Kamaci H.O., Saka Ş., Firat K., Otgucuoğlu Ö., Küçüksarı H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280: 140-145.
- Talas Z.S., Gulhan M.F. 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1994-1998.
- Villanueva J., Vanacore R., Goicoechea O., Amthauer R. 1997. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. *Journal of Experimental Zoology*, 279: 347-355.
- Worthington C.C. 1988. *Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation. New Jersey: Freehold. 231P.
- Yanbo W., Zirong X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 283-292.
- Yar-Ahmadi P., Moradi N., Ghysvandi N. 2014. The effect of dietary supplemented with Synbiotic (Biomin IMBO®) on growth performance, carcass composition, hematological and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, Cyprinidae). *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4(3): 2129-2139.
- Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.R., Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252: 516-524.
- Zokaeifar H., Babaei N., Saad C.R., Kamarudin M.S., Sijam K., Balcazar J.L. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 68-74.

