

Effect of different level of *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, hematological parameters and intestinal microbiota in *Poecilia reticulata*

Farzaneh Vakili¹, Farid Firouzbakhsh^{2*},
Sekineh Yeganeh³

1. Former M.Sc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
 2. Associated professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
 3. Associated professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
- (Received: Jan. 6, 2016 - Accepted: Aug. 20, 2017)

Abstract

The present study was performed to investigate the effects of various levels of dietary *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on the growth performance, survival rate, hematological parameters and intestinal microbiota of guppy (*Poecilia reticulata*). For this purpose one-thousand and eight hundred guppy larvae with 7 mg mean weight in a completely randomized design with 4 treatments and 3 replicates of *L. acidophilus* in the diet, including no bacteria (control), 1.5×10^7 , 3×10^7 , 6×10^7 CFU g⁻¹ (T₂, T₃, T₄ respectively) were considered and fed for 16 weeks. The results showed that significant differences ($P < 0.05$) in weight gain, FCR and SGR were found between T₄ and control group. The highest amount of white blood cell count (9.70 ± 0.1) was observed in 4 group and had significant different ($P > 0.05$) with control (5.96 ± 0.2). The highest amount of intestinal of *Lactobacillus* was observed in 4 group compared to other groups and control ($P < 0.05$). The present study results suggested that *L. acidophilus* (6×10^7 CFU g⁻¹) have significant effect on growth and white blood cell count of guppy.

Keywords: Guppy, growth, hematology, intestinal microbiota, *Lactobacillus acidophilus*.

اثر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و جمعیت باکتریایی روده ماهی گویی (*Poecilia reticulata*)

فرزانه وکیلی^۱، فرید فیروزبخش^{۲*}، سکینه یگانه^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
 ۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
 ۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۵/۲۹)

چکیده

این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر سطوح مختلف باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) به عنوان مکمل غذایی بر میزان رشد، بازماندگی، فراسنجه‌های خونی و فلور باکتریایی روده ماهی گویی (*Poecilia reticulata*) انجام پذیرفت. به همین منظور ۱۸۰۰ لارو ماهی گویی با میانگین وزن ۷ میلی گرم در ۴ گروه با ۳ تکرار شامل جیره غذایی فاقد باکتری به عنوان شاهد (گروه ۱) و جیره‌های دارای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در سه سطح 1.5×10^7 ، 3×10^7 ، 6×10^7 CFU g⁻¹ (گروه ۲، ۳ و ۴) و 6×10^7 (گروه ۴) واحد کلنی بر گرم غذا به مدت ۱۶ هفته تغذیه شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که از نظر افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه بین گروه ۴ و گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایش اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد. بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در گروه ۴ (9.70 ± 0.1) مشاهده شد که با گروه شاهد (5.96 ± 0.2) اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت. بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس روده ماهیان در گروه ۴ مشاهده شد که با گروه شاهد و سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت. نتایج نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به مقدار 6×10^7 واحد کلنی بر گرم غذا اثر معنی‌داری بر رشد، تعداد گلبول‌های سفید و جمعیت باکتریایی روده ماهی گویی دارد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ماهی گویی، رشد، خون شناسی، جمعیت باکتریایی روده.

مقدمه

همچنین با افزایش جذب اسیدهای چرب می‌تواند روند زرده‌سازی تخمک‌ها را افزایش دهد و بلوغ اووسیت را تسهیل نماید (Dahlgren, 1980). از آنجایی که اهمیت اقتصادی ماهیان آکواریومی کمتر از ماهیان خوراکی نیست، بنابراین تحقیق و مطالعه در تمام زمینه‌های پرورش از جمله رشد، میزان بقا و همچنین افزایش میزان مقاومت در برابر بیماری اهمیت دارد. لذا هدف از این تحقیق استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی ماهی گوپی و بررسی عملکرد رشد، تغییرات فراسنجه‌های خونی و فلور میکروبی روده ماهی گوپی است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مورد استفاده در این بررسی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با کد QA/G/751/01/02 تهیه شد. نمونه باکتریایی مورد نظر در محیط کشت MRS به صورت خطی کشت داده شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C نگهداری شد. پس از مشاهده رشد باکتری، مقداری از باکتری‌ها به داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰cc محیط کشت مایع تزریق شد و پس از یکنواخت شدن به وسیله شیکر مجدداً داخل انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس بر مبنای نیم مک فارلند به وسیله اسپکتوفتومتر غلظت محیط کشت در طول موج 600nm اندازه گیری شد و محیط کشت حاوی باکتری با غلظت‌های صفر (شاهد)، 1×10^7 CFU/g، 3×10^7 CFU/g (شاهد)، 6×10^7 CFU/g به ترتیب برای تیمار ۱، ۲، ۳ و ۴ آماده سازی شد.

آماده سازی تیمارها

این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شرکت گرگان ماهی در کیلومتر ۷ جاده گرگان به

ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) از خانواده پوئسیلیده (*Poeciliidae*) بومی آمریکای مرکزی و شمال آمریکای جنوبی است (Aliasghari & Firouzbaksh, 2011). این ماهی در سال ۱۹۴۰ به آب‌های کلمبیا و چند کشور گرمسیری دیگر برای کنترل بیولوژیکی لارو حشراتی که ناقل بیماری‌های عفونی (مانند مالاریا) بودند، معرفی شد. ماهیان زینتی زنده‌زا در بین طرفداران و پرورش دهندگان به دلیل رنگ‌های درخشان، پذیرفتن انواع خوراک و تولید نوزاد ماهی به تعداد زیاد محبوب‌ترین ماهیان زینتی هستند (Gosh et al., 2008).

پروبیوتیک برای مدت زیادی است که در آبی‌پروری استفاده می‌شود اما در سال‌های اخیر برای افزایش رشد و مقاومت در برابر بیماری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این راهکار مزیت‌های بی‌شمار برای فائق آمدن بر محدودیت‌ها و اثرات زیان‌آور آنتی‌بیوتیک و داروهای دیگر دارد و همچنین با افزایش رشد و مقاومت در برابر بیماری منجر به افزایش در تولید می‌شود (Das et al., 2008; Sahu et al., 2008).

در صنعت ماهیان زینتی دو اصل مهم یعنی سلامت و تغذیه ماهیان تعیین‌کننده تجارت و موفقیت است. عدم استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی برای افزایش سطح سلامتی و تغذیه منجر به مقاومت دارویی در برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شود. مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها می‌تواند از طریق رقابت برای دریافت مواد مغذی، جایگاه‌های اتصال، تغییر متابولیسم باکتری‌ها یا تحریک سیستم ایمنی بدن مانع تشکیل کلنی باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش میزبان گردد (Nayak, 2010). باکتری‌های پروبیوتیکی باعث افزایش کارایی هضم برای ترکیبات پروتئینی و چربی‌ها موجود در جیره می‌شود و نرخ جذب در بدن میزبان را بالا می‌برد (Gosh et al., 2008).

شدند. بچه ماهیان در سه روز اول فقط با ناپلی آرتیمیا و پس از آن از غذای دستی (جدول ۱) به مدت ۱۶ هفته تغذیه شدند. غذادهی به ماهیان روزانه ۳ نوبت (۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۳ بعدازظهر) با جیره‌های دارای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان صفر (گروه ۱)، 1×10^6 CFU/g (گروه ۲)، 3×10^6 CFU/g (گروه ۳) و 6×10^6 CFU/g (گروه ۴) انجام شد. برای گروه ۱ (شاهد) از محیط کشت مایع بدون باکتری استفاده شد و به جیره اضافه گردید. آماده سازی غذا هر دو هفته انجام شد و در ظروف در بسته در دمای 4°C نگهداری شد.

شصت کلا انجام شد. تعداد ۱۸۰۰ قطعه ماهی گوپی (*P. reticulata*) یکروزه با میانگین وزن ۷ میلی‌گرم از حوضچه مولدین گوپی به نسبت ۵ ماده به یک نر جمع آوری و به داخل آکواریوم انتقال داده شدند. آب مورد نیاز آکواریوم‌ها از یک حلقه چاه تأمین شد. دمای آب آکواریوم‌ها $26 \pm 0.22^\circ\text{C}$ ، اسیدیته 7.8 ± 0.1 ، اکسیژن محلول 8.7 ± 0.66 میلی‌گرم بر لیتر اندازه گیری شد.

بچه ماهیان یکروزه گوپی به‌طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم (هر آکواریوم ۱۵۰ قطعه بچه ماهی) به ابعاد $30 \times 60 \times 100$ سانتی‌متر با ۱۵۰ لیتر آب تقسیم

جدول ۱. ترکیب جیره غذایی پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان گوپی (درصد)

| ترکیب جیره | آرد سویا | آرد ذرت | آرد گندم | آرد جو | پودر ماهی | مکمل | ویتامین* |
|------------|----------|---------|----------|--------|-----------|------|----------|
| درصد | ۲۵ | ۳۶ | ۱۵ | ۱۵ | ۷ | ۱ | ۱ |

* هر ۱۰۰ گرم پرمیکس ویتامین حاوی ۱۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۳۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3، ۵ گرم تیامین، ۵ گرم ریوفلاوین، ۶ گرم نیاسین، ۴ گرم پیریدوکسین، ۱ گرم اسید فولیک، ۴ میلی‌گرم سیانو کوبال آمین، ۳۰ گرم ویتامین C، ۳ گرم ویتامین K، ۹ گرم توکوفرول.

عملکرد رشد

برای محاسبه شاخص‌های رشد از روابط زیر استفاده شد.

(۱) افزایش وزن بدن:

= افزایش وزن بدن بر حسب گرم
وزن ابتدایی به گرم - وزن نهایی به گرم

(۲) ضریب رشد ویژه () Specific Growth Rate: (SGR)

SGR = $100 \times \{(\ln w_2 - \ln w_1) / (\text{تعداد روزهای پرورش})\}$

که در آن: $\ln = \ln w_2$ میانگین وزن ثانویه به گرم و $\ln = \ln w_1$ میانگین وزن اولیه به گرم می‌باشد.

(۳) ضریب تبدیل غذایی () Food Conversion (Ratio: FCR)

ضریب تبدیل غذایی عبارت است از نسبت غذای خورده شده به مقدار افزایش وزن حاصله
مقدار غذای خورده شده به گرم = ضریب تبدیل غذایی / مقدار افزایش وزن بدن به گرم

(۴) شاخص وضعیت (Condition Factor: CF)

نسبت وزن ماهی به طول آن که به صورت شاخص وضعیت نشان داده می‌شود، که نشان‌دهنده چگونگی وزن ماهی در ارتباط با طول آن بوده و عاملی است که برای کنترل و بررسی میزان رشد ماهی با تعیین مقدار غذایی که باید در کارگاه به آن داده شود به کار می‌رود.

$$CF = \frac{w \times 100}{L^3}$$

W = وزن به گرم

L = طول به سانتی‌متر (طول چنگالی)

(۵) درصد بازماندگی (Survival Rate: SR)

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روده ماهی گوپی تغذیه شده با سطوح مختلف این باکتری در انتهای دوره آزمایش روده ۱۰ عدد ماهی از هر تیمار برداشت شد و برای شمارش کلی باکتری‌ها به محیط کشت پلیت کانت آگار Plate Count Agar و برای شمارش کلی لاکتوباسیلوس‌ها، به محیط کشت حاوی MRS منتقل و به مدت ۵ شبانه‌روز در دمای 25°C - 23°C نگهداری شدند. سپس کلنی باکتری‌ها به وسیله دستگاه کلنی کانت شمارش جمعیت باکتریایی روده بر اساس CFU/g تعیین شد (Akrami et al., 2009).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. برای تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نیز از روش آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن با سطح اطمینان $P < 0.05$ تعیین گردید. تجزیه و تحلیل به وسیله نرم‌افزار SPSS 17 انجام پذیرفت.

نتایج

نتایج عملکرد رشد ماهیان گوپی در جدول ۲ نشان می‌دهد که بین تیمار ۴ (6×10^7 CFU/g) با گروه شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی از نظر وزن نهایی، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P < 0.05$). در حالی که بین سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری یافت نشد.

جهت بررسی نرخ بقاء از ابتدای دوره تا انتهای آن تلفات به طور روزانه ثبت و در انتها درصد تلفات در تیمارهای مختلف با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

= نرخ بقا

(تعداد ماهی ابتدایی) / (تعداد ماهی مرده - تعداد

ماهی ابتدایی) $\times 100$

پارامترهای خون‌شناسی

در انتهای دوره پرورش از هر تکرار ۳۰ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با پودر گل میخک به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر (Hoseinifar et al., 2015) به روش قطع ساقه دمی خونگیری انجام شد. شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با محلول رقیق‌کننده نات و هر یک به وسیله لام هموسیئومتر نتوبار بر حسب میلی‌متر مکعب محاسبه شد. برای شمارش افتراقی انواع گلبول‌های سفید، پس از تهیه گسترش از خون، با متانل با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد تثبیت و با گیمسا رنگ آمیزی شد (رنگ گیمسا با رقت ۱/۱۰ تهیه شده از استوک به مدت ۱۵ دقیقه) و پس از خشک کردن یک قطره روغن سدر روی گستره ریخته و با عدسی ۱۰۰، صد عدد گلبول سفید را به تفکیک، شمارش و بر حسب درصد گزارش گردید (Bullis, 1993).

آزمایش باکتریایی

به منظور بررسی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت

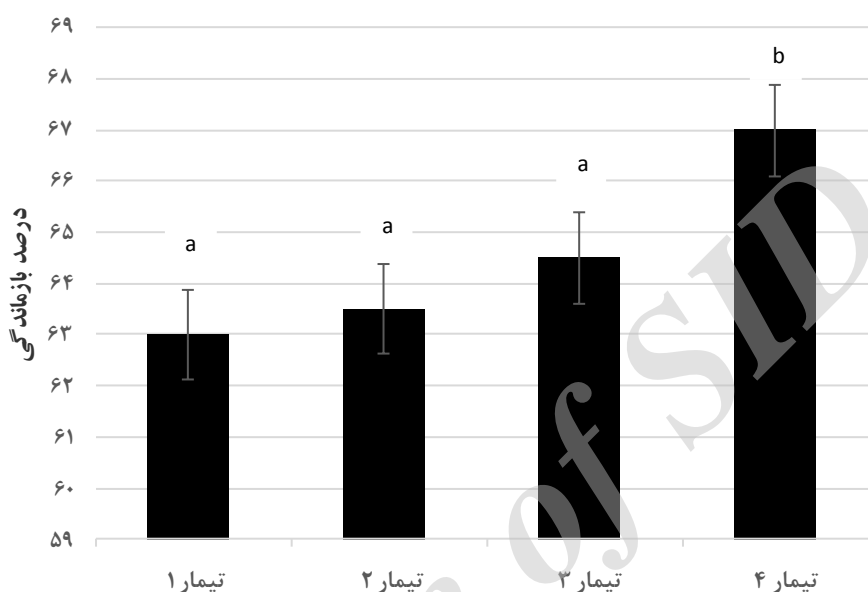
جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فاکتورهای رشد ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذایی

| تیمارهای آزمایشی | تیمار ۱ (شاهد) | تیمار ۲ | تیمار ۳ | تیمار ۴ |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | (شاهد) | $1/5 \times 10^7$ CFU/g | 3×10^7 CFU/g | 6×10^7 CFU/g |
| وزن اولیه (میلی‌گرم) | $7/1 \pm 0/95$ | $7 \pm 0/92$ | $7/1 \pm 0/96$ | $7 \pm 0/98$ |
| وزن نهایی (میلی‌گرم) | 246 ± 50^b | 245 ± 56^b | 251 ± 52^b | 309 ± 50^a |
| طول نهایی (سانتی‌متر) | $2/7 \pm 0/2^b$ | $2/8 \pm 0/2^b$ | $2/8 \pm 0/2^b$ | $3/1 \pm 0/1^a$ |
| ضریب تبدیل غذایی | $4/79 \pm 0/98^b$ | $4/82 \pm 1/02^b$ | $4/86 \pm 1/02^b$ | $3/47 \pm 0/65^a$ |
| شاخص وضعیت (درصد) | $1/07 \pm 0/27^a$ | $1/19 \pm 0/37^a$ | $1/15 \pm 0/21^a$ | $1/04 \pm 0/31^a$ |
| نرخ رشد ویژه (درصد روز) | $2/95 \pm 0/16^b$ | $2/94 \pm 0/17^b$ | $2/96 \pm 0/15^b$ | $3/14 \pm 0/13^a$ |

در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است. داده‌های فوق به صورت Mean \pm SD نشان داده شده است.

فقط تیمار ۴ (6×10^7 CFU/g) اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با گروه شاهد نشان داده است و سایر تیمارها علی رغم افزایش درصد بازماندگی، اختلاف معنی داری با شاهد نداشته‌اند.

نتایج درصد بازماندگی نشان می‌دهد که با افزایش تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی درصد بقا افزایش می‌یابد هرچند که در مقایسه آماری افزایش بازماندگی بین تیمارها با گروه شاهد



شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر درصد بازماندگی ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذایی. تیمار ۱ (شاهد)، تیمار ۲ ($1/5 \times 10^7$ CFU/g)، تیمار ۳ (3×10^7 CFU/g)، تیمار ۴ (6×10^7 CFU/g)

تعداد گلبول سفید در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شده است که با تیمار ۲ و شاهد اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) دارند. بیشترین تعداد گلبول‌های قرمز نیز در تیمار ۴ مشاهده شده است که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) دارد.

نتایج فراسنجه‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، درصد نوتروفیل، لنفوسیت و ائوزینوفیل در انتهای دوره پس از تغذیه با جیره حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک در جدول ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد بیشترین

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فاکتورهای خونی ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذایی

| تیمارهای آزمایشی | تیمار ۱ (شاهد) | تیمار ۲ | تیمار ۳ | تیمار ۴ |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | (شاهد) | $1/5 \times 10^7$ CFU/g | 3×10^7 CFU/g | 6×10^7 CFU/g |
| گلبول سفید (10^3 میلی‌متر مکعب) | $5/966 \pm 0/3^c$ | $6/733 \pm 0/25^b$ | $9/433 \pm 0/25^a$ | $9/7 \pm 0/1^a$ |
| گلبول قرمز (10^6 میلی‌متر مکعب) | $0/873 \pm 0/03^c$ | $0/874 \pm 0/03^c$ | $0/924 \pm 0/01^b$ | $0/939 \pm 0/01^a$ |
| نوتروفیل (درصد) | $6/6 \pm 0/5^b$ | $8 \pm 0/1^{ab}$ | $9/4 \pm 0/3^a$ | $9/4 \pm 0/6^a$ |
| لنفوسیت (درصد) | $92/6 \pm 0/5^a$ | $91/4 \pm 1^a$ | $90/3 \pm 1^a$ | $90/3 \pm 1^a$ |
| ائوزینوفیل (درصد) | $0/3 \pm 0/5^a$ | $0/6 \pm 0/3^a$ | $0/3 \pm 0/5^a$ | $0/3 \pm 0/5^a$ |

در هر ردیف، اختلاف معنی دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است. داده‌های فوق به صورت Mean \pm SD نشان داده شده است.

شد ($P < 0/05$). از نظر تعداد کل لاکتوباسیلوس در هفته شانزدهم اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) بین گروه شاهد و دیگر تیمارها به دست آمد. بر اساس جدول شماره ۶ با افزایش تعداد باکتریای جیره جمعیت باکتریای روده نیز افزایش یافته است.

نتایج شمارش کلی باکتری‌ها در محیط کشت پلیت کانت آگار نشان داد تعداد کل باکتری‌های روده در هفته شانزدهم اختلاف معنی‌داری در مقایسه بین گروه شاهد با دیگر گروه‌ها دارد. همچنین در بین تیمارهای حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده

جدول ۴. شمارش کلی باکتری‌ها و تعداد لاکتوباسیلوس‌ها در تیمارهای مختلف ماهی گوپی تغذیه شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ۱۶ هفته

| تیمار ۴ | تیمار ۳ | تیمار ۲ | تیمار ۱ (شاهد) | تیمارهای آزمایشی |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|
| 6×10^7 CFU/g | 3×10^7 CFU/g | $1/5 \times 10^7$ CFU/g | | شمارش کلی میکروبی CFU/g |
| $6/4 \times 10^7$ a | 3×10^7 b | $1/2 \times 10^7$ c | 9×10^6 d | تعداد لاکتوباسیلوس CFU/g |
| 10^6 a | 3×10^5 b | 2×10^5 c | $5/5 \times 10^2$ d | |

در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است. داده‌های فوق به صورت Mean \pm SD نشان داده شده است.

میزان رشد در ماهی سی‌بس (*Dicentrarchus labrax*) جوان در تیمارهای تغذیه‌شده با روتیفر و آرتمیای غنی شده با باکتری لاکتوباسیلوس دلبراک (*Lactobacillus delbrueckii*) اختلاف معنی‌داری داشتند (Carnevali et al., 2006). در مطالعه حاضر نیز افزودن باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به غذای ماهی گوپی، افزایش رشد آنها را به همراه داشت.

Gosh et al. (2008) گزارش کردند که افزودن باکتری *B. subtilis* متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک به مقدار 5×10^6 و 5×10^8 CFU/g به جیره غذایی ماهیان زنده‌زا از جمله گوپی با وزن تقریبی ۱۶۰ میلی‌گرم سبب افزایش نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش بقاء می‌گردد. در مطالعه‌ای که Neissi et al. (2013) انجام دادند باکتری پدیوکوکوس (*Pediococcus*) را با غلظت $0/9 \times 10^7$ CFU/g به جیره غذایی ماهی گرین ترور افزودند و در انتهای دوره آزمایشی افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی را مشاهده کردند (Neissi et al., 2013). در مطالعه حاضر نیز همانند نتایج این محققان افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان 6×10^7 CFU/g در جیره غذایی ماهیان گوپی نرخ رشد ویژه را افزایش و ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر در آبی‌پروری پروبیوتیک در جیره به‌عنوان افزایش‌دهنده رشد و بهبوددهنده محیط پرورش شناخته شده است (Al-dohali et al., 2009). افزایش رشد در ماهی همانطور که Fuller (1989) گزارش کرده است ممکن است به دلیل بهینه‌سازی تعادل فلور میکروبی روده توسط باکتری‌های پروبیوتیکی باشد. باکتری‌های پروبیوتیکی در هضم و جذب ترکیبات غذایی غیر قابل هضم و تخریب ترکیبات ضد تغذیه‌ای بویژه الیگوساکاریدها موثر هستند و همچنین با تحریک تولید ترکیبات ضروری غذا از جمله ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و آنزیم‌ها مانند آمیلاز و پروتئاز سبب بهبود هضم و جذب غذا در نتیجه رشد بهتر میزبان می‌گردند (Gatesoupe et al., 1999). باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس قادر به ترشح رنج وسیعی از آنزیم‌ها هستند که به جذب غذایی کمک می‌کنند. محققان گزارش کردند فعالیت آنزیمی ماهیان با افزودن مکمل پروبیوتیکی به جیره غذایی افزایش می‌یابد (Suzer et al., 2008; Tovar et al., 2004; Yanbo & Zirong, 2006). Carnevali et al. (2006) گزارش کردند که

تیمارهایی که با باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با مقدار 3×10^7 تغذیه شده بودند غلظت گلبول‌های قرمز و سفید نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. افزایش میزان گلبول‌های قرمز که در نتیجه اضافه کردن پروبیوتیک به جیره به وجود می‌آید در نهایت موجب افزایش انتقال اکسیژن در خون می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز موجود در هموگلوبین موجب افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک می‌شود و در نتیجه برای بافتی که اکسیژن زیادی نیاز دارد اکسیژن بیشتری فراهم می‌شود (Firouzbakhsh *et al.*, 2011). در آزمایشی که در سال ۲۰۰۲ انجام شد محققان دریافتند که استفاده از پروبیوتیک می‌تواند باعث افزایش RBC، WBC و به‌ویژه درصد لنفوسیت‌ها شود (Irianto & Austin, 2002). در تحقیق حاضر نیز با افزایش میزان پروبیوتیک جیره، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز و سفید مشاهده شد.

پروبیوتیک‌ها سلول‌های میکروبی زنده‌ای هستند که با تغییر فلور میکروبی روده باعث افزایش سطح سلامتی میزبان می‌شوند (Fuller, 1989). افزایش تعداد لاکتوباسیلوس در تیمارهای تغذیه شده با این پروبیوتیک نشان می‌دهد که دستگاه گوارش ماهی گوپی محیط مناسبی برای افزایش و ازدیاد لاکتوباسیلوس است که این افزایش در نهایت منجر به افزایش رشد، افزایش در تعداد سلول‌های خونی در این ماهی شده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان پیشنهاد کرد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس اثرات پروبیوتیکی در ماهی گوپی داشته لذا می‌توان از این باکتری برای افزایش رشد و بازماندگی گوپی به‌ویژه در اوایل دوره رشد استفاده کرد.

همانطور که Rollo *et al.* (2006) در ماهی سی‌بریم (*Sparus aurata*) گزارش کردند، افزایش درصد بازماندگی در تیمار پروبیوتیکی می‌تواند به علت افزایش افزایش مقاومت ماهیان در برابر شرایط نامطلوب باشد که ممکن است در طول دوره پرورش در محیط پرورش به وجود آید (Rollo *et al.*, 2006). همچنین افزایش بازماندگی ناشی از مصرف باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گربه ماهی (Hybrid Catfish Heteroclaris) (Yisa *et al.*, 2015) و تیلایپای نیل (Villamil *et al.*, 2014) هم گزارش شده است. در تحقیق حاضر نیز بیشترین و کمترین درصد بازماندگی ماهی گوپی به ترتیب در گروه ۴ و شاهد مشاهده شد که حکایت از تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر درصد بازماندگی ماهیان دارد.

در این آزمایش شمارش سلول‌های خونی در تیمارهای پروبیوتیکی و تیمار شاهد به خوبی نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی فاکتورهای خونی تأثیر مثبت داشته است. به‌طوری‌که تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نشان داده است. این نتایج نشان‌دهنده آن است که با افزایش پروبیوتیک سلامت و سطح ایمنی بدن ماهی افزایش یافته است (Ranzani-Paiva *et al.*, 2000; Irianto & Austin, 2002).

افزایش تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ممکن است بدلیل افزایش پاسخ سیستم ایمنی رخ داده باشد (Panigrahi *et al.*, 2005). در آزمایشی که Al-Dohail *et al.* (2009) بر روی گربه ماهی آفریقایی انگشت قد انجام دادند در

REFERENCES

Akrami, R.; Hajimoradloo, A.; Matinfar, A.; Abedian Kenari, A.; (2009). Effect of Dietary Prebiotic Inulin on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body

Composition and Hematological Parameters of Juvenile Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society*; 6: 771-779.

- Al-Dohail, M.A.; Hashim, R.; Aliyu-Paiko, M.; (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell1822) fingerling. *Aquaculture Research*; 40: 1642-1652.
- Bullis, R.A.; (1993). Clinical pathology of temperate freshwater and estuarine fishes. In: stoskopf MK (ed) fish medicine. W.B. Sanders Co., Philadelphia; 232-239.
- Carnevali, O.; Vivo, L.; Sulpizio, R.; Gioacchini, G.I.; Olivotto, I.; Silvi, S.; Cresci, A.; (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*; 258: 430- 438.
- Dahlgren, B.T.; (1980). The effects of three different dietary protein levels on the fecundity in the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). *Journal of Fish Biology*; 16: 83-97.
- Das, S.; Ward, L.R.; Burke, C.; (2008). Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 81: 419-429.
- Firouzbaksh, F.; Aliasghari, M.; (2011). An illustrated encyclopedia of freshwater aquarium fish. 2nd ed. Tehran, Patove Vagheh. P 157.
- Firouzbaksh, F.; Noori, F.; Khalesi, M.K.; Jani-khalili, K.; (2011). Effect of a probiotic, protexin, on growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus cellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*; 37: 833-842.
- Fuller, R.; (1989). Probiotic in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*; 66: 365-378.
- Gatesoupe, F.J.; (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*; 180: 147-165.
- Gosh, S.; Sinha, A.; Sahu, C.; (2008). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*; 14: 289-299.
- 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 & Shellfish Immunology*; 42(2): 533-538.
- Irianto, A.; Austine, B.; (2002). Probiotic in aquaculture. *Journal of Fish Disease*; 25: 633-642.
- Nayak, S.K.; (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*; 29: 2-14.
- Neissi, A.; Rafiee, G.; Nematollahi, M.; Safari, O.; (2013). The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. *Fish and Shellfish Immunology*; 35: 1976-1980.
- Panigrahi, A.; Kiron, J.; Puangkaew, T.; Kobayashi, S.; Sugita, H.; (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*; 243: 24 1-254.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; das Eiras, A.A.; Felizardo, N.N.; (2000). Haematological analysis of 'chara' *Pseudoplatystoma fasciatum* in captivity. *Aqua Responsible aquaculture in the new millennium*, Nice, France, European Aquaculture Society special publication 28, 590pp.
- Rollo, A.; Sulpizio, R.; Nardi, M.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Caggiano, M.; Cresci, A.; Carnevali, O.; (2006) Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*; 32: 167-177.
- Sahu, M.K.; Swarnakumar, N.S.;

- Sivakumar, K.; Thangaradjou, T.; Kannan, L.; (2008). Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*; 12: 1-10.
- Suzer C.; Coban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuogflu, O.; Kucuksari, 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.
- Tovar, D.; Zambonino, I.J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; -Juarez, R.; (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*; 234: 415-427.
- Villamil, L., Reyes, C.; Martínez-Silva, M.A.; (2014). In vivo and in vitro assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. *Aquaculture Research*; 45(7): 1116-1125.
- 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.
- Yisa, T. A., Ibrahim, O. A., Tsadu, S. M.; Yakubu, U.P.; (2015). Effect of Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) as Immune Stimulant on Hybrid Catfish Heteroclaris. *British Microbiology Research Journal*; 9(1): 1-6.

Archive of SID