

## اثرات پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر هماتولوژی، فراسنجه‌های خونی و

### هیستوپاتولوژی روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان

خدیدجه عطایی<sup>۱</sup>، سید محمد علی جلالی<sup>۱</sup>، فرود یداللهی<sup>۱</sup>، آذر همت زاده<sup>۱</sup>

۱- دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران. Fish.nutritionist@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۰

#### چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های غیر بیماری‌زای تولیدکننده‌ی اسیدلاکتیک نقش مهمی در فلور میکروبی روده حیوان میزبان داشته و با تاثیر گذاری بر مجرای گوارشی، کاهش pH و ارتقا ایمنی سبب بهبود عملکرد ماهی می شوند. به منظور مطالعه اثرات فیزیولوژیکی تغذیه باکتری *Pediococcus acidilactici* بر ماهی قزل آلائی رنگین کمان آزمایش زیر انجام گرفت.

روش کار: تعداد ۹۶ ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن اولیه ۶۰ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی به ۶ وان پلی اتیلنی اختصاص یافتند و به مدت هشت هفته با دو جیره غذایی شامل شاهد و جیره آزمایشی دارای پدیوکوکوس اسید لاکتسی به مقدار ۱۰<sup>۹</sup> CFU در کیلوگرم جیره در سه وعده در حد اشتهای ظاهری تغذیه شدند. عملکرد رشد، وزن نهایی، وزن نسبی لاشه و کبد و فراسنجه های خونی و هماتولوژیکی و نیز هیستوپاتولوژی روده ماهی‌ها در پایان آزمایش ارزیابی گردید.

یافته‌ها: افزودن باکتری *Pediococcus acidilactici* به عنوان پروبیوتیک به جیره‌ی غذایی اثری بر افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، وزن نهایی، شاخص وضعیت، وزن نسبی لاشه و کبد ماهی‌ها نداشت اما درصد تلفات ماهی‌ها را کاهش معنی دار داد ( $P < 0/05$ ). تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل خون ماهی‌ها و نیز عرض پرزهای روده با تغذیه باکتری *Pediococcus acidilactici* افزایش معنی دار یافت ( $P < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: افزودن پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به جیره غذایی سبب بهبود ایمنی و بقا ماهی قزل آلائی رنگین کمان در دوره رشد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، فیزیولوژی، قزل آلائی رنگین کمان.

#### مقدمه

ماهیان، قادر است محدوده وسیع تری از دمای آب و متغیرهای محیطی از جمله کیفیت آب را تحمل کند، ولی به مقدار زیادی اکسیژن محلول در آب نیاز دارد. هر چند این ماهی اساساً جزو ماهیان سردابی تقسیم بندی می‌شود اما دمای مناسب برای پرورش این ماهی ۱۶-۱۲ درجه سانتی گراد است. پذیرش غذاهای دستی، سرعت زیاد در رشد، بازار پسندی مناسب و ارزش غذایی بالا از مهم ترین دلایل توسعه پرورش این ماهی است (۲۱). در صنعت آبرزی پروری هزینه های خوراک به طور معمول ۳۰ تا ۷۰ درصد از کل عملیات پرورش ماهی را شامل گردیده و تغذیه نقش مهمی در میزان رشد و عملکرد

ماهی قزل آلائی رنگین کمان با نام علمی *Oncorhynchus mykiss* یکی از مهم ترین ماهی های پرورشی سازگار به آب شیرین است. این ماهی همانند سایر آزاد ماهیان دارای یک باله چربی کوچک بین باله پشتی و دم، در دو طرف بدن دارای یک نوار پهن به صورت رنگین کمان، روی سر، بدن، پشت و باله دمی آن لکه های تیره رنگی مشاهده می‌شود (۳) و در کانال-ها (آبراهه ها) بتنی یا خاکی به صورت متراکم پرورش می یابد که تراکم جمعیت ماهی های پرورشی به جریان و کیفیت آب از جمله دما و میزان اکسیژن محلول بستگی دارد (۲۱). ماهی قزل آلائی رنگین کمان در بین سایر آزاد

سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری دارد (۲۱). در این راستا استفاده از مکمل‌های غذایی مختلف در جهت کاهش آلودگی‌های زیست محیطی، افزایش قابلیت هضم خوراک، بهبود استفاده از مواد مغذی و نیز ارتقا سیستم ایمنی برای رشد و تولید ماهی اهمیت زیادی دارد (۲). اخیراً استفاده از پروبیوتیک‌ها، به عنوان مکمل‌های غذایی که سبب مقاومت در برابر بیماری، بهبود رشد و استفاده بهینه خوراک در پرورش ماهی می‌شوند اهمیت زیادی یافته است (۱۴). پروبیوتیک‌ها، معمولاً به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده با ویژگی‌های مفید تعریف می‌شوند که هم برای درمان بیماری و هم به عنوان روش پیشگیری کننده مرتبط با پاتوژن‌ها مورد قبول قرار گرفته‌اند (۱۵). به طور کلی پروبیوتیک در حیوانات آبی شامل هر سلول میکروبی است که با جیره غذایی یا آب به ماهی میزبان، پرورش دهنده و یا مصرف کننده‌ی ماهی سود برساند و این اثر را حداقل با بهبود تعادل میکروبی در بدن ماهی سبب گردد (۱۴). باکتری‌های اسیدلاکتیکی دسته مهمی از پروبیوتیک‌ها هستند که در ماهی متعلق به جنس‌های انتروکوکوس‌ها، استرپتوکوک‌ها، پدی‌کوکوس‌ها، لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و لئوکونوستاک‌ها می‌باشد (۱۸). علت این که روی این باکتری‌ها بیشتر تأکید می‌شود تا اندازه‌ای مربوط به این واقعیت است که باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک نقش مهمی در فلور روده داشته و بر مجرای گوارشی تأثیر می‌گذارند هم‌چنین غیر بیماری‌زا بوده و علاوه بر این می‌توانند اسیدیته را که معمولاً برای باکتری‌های دیگر کشنده می‌باشند تحمل کرده و با تولید اسیدلاکتیک از رشد میکروب‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (۱۰). این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در ناحیه‌ی روده با تولید اسیدهای آلی و مواد ضد میکروبی مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شوند و اسیدهای آلی تولید شده می‌توانند به عنوان یک منبع

انرژی مورد استفاده سلول‌های روده قرار گیرند (۱۹). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که طیف وسیعی از باکتریوسن‌ها به نام پدیوسین (pediocin) توسط *Pediococcus acidilactici* تولید می‌شود (۵). تولید پدیوسین‌ها و اسیدهای آلی مانند اسید استیک و اسید لاکتیک خصوصیت تقابل با باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به خصوص گونه‌های ویبریو دارد (۷). به کارگیری پروبیوتیک‌ها در آبیان، دارای اثرات مفیدی مانند بهبود سیستم ایمنی، بقا و ایجاد مقاومت به بیماری است (۱۰) که با بررسی چگونگی اثر گذاری آن‌ها بر فراسنجه‌های فیزیولوژیکی حیوان، می‌توان فرآیندهای اثر گذاری باکتری‌های مفید بر ماهی را تا حدودی شناخت. این پژوهش به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر عملکرد لاشه، فراسنجه‌های خونی و هماتولوژیکی و نیز بافت روده ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در دوره رشد می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در پایلوت تحقیقاتی شرکت فرادانه واقع در مزرعه پرورش ماهی دشت آبی استان چهارمحال بختیاری انجام گرفت. از تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان که به منظور تطابق پذیری با شرایط آزمایش به مدت دو هفته با جیره شاهد فاقد پروبیوتیک تغذیه شده بودند، تعداد ۹۶ قطعه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با وزن اولیه  $2 \pm 60$  گرم انتخاب و در یک طرح کاملاً تصادفی به ۶ وان پلی‌اتیلنی ۳۰۰ لیتری، به تعداد ۱۶ ماهی در هر وان، اختصاص یافتند. دو جیره غذایی شامل، شاهد و جیره آزمایشی دارای باکتری پدیوکوکس اسید لاکتیکی در سه وعده (ساعت‌های ۱۳، ۸، ۱۸) و در حد اشتهای ظاهری به مدت هشت هفته به ماهی‌های شش وان تغذیه شدند. به منظور تهیه جیره آزمایشی از خوراک اکستروود شرکت فرادانه (Grower Feed: GFT1) بدون روغن استفاده گردید. سپس در تیمار

دقت ۰/۰۱ گرم توزین و راندمان لاشه و شاخص کبدی ماهی‌ها با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (۱):

شاخص کبدی: [وزن کبد(گرم) ÷ وزن کل بدن(گرم)] × ۱۰۰

راندمان لاشه: [وزن لاشه(گرم) ÷ وزن کل بدن(گرم)] × ۱۰۰

فراسنجه‌های سرمی خون مانند تری گلیسیرید، پروتئین تام و آلومین به روش نورسنجی و با استفاده از کیت‌های درمان کاو و با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری، گلوبولین با تفاضل آلومین از پروتئین تام سرم خون محاسبه گردید (۱). تمامی اندازه‌گیری‌های خون با دو تکرار انجام گرفت. فراسنجه‌های هماتولوژیکی خون مانند هماتوکریت (PCV)، تعداد گلبول قرمز (RBC) و سفید (WBC)، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، نوتروفیل و غیره) و نیز غلظت هموگلوبین (Hb) با استفاده از نمونه‌های خون دارای ماده ضد انعقاد اندازه‌گیری گردید (۱۶). پس از خونگیری از انتهای روده ماهی‌ها، در حدود یک سانتی-متر از روده جدا و به فرمالین ۱۰ درصد منتقل و به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. آبگیری با استفاده از الکل‌ها بدرجات مختلف از نمونه‌ها انجام و با انتقال آن‌ها به گزین و سپس قرار دادن در پارافین، امکان برش با استفاده میکروتوم مهیا و رنگ آمیزی و پایداری با هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. شاخص‌های پرز روده مانند طول، عرض، ارتفاع و ضخامت ماهیچه اندازه‌گیری گردید (۲۲).

برای آنالیز داده‌های آزمایشی از نرم افزار آماری SAS و از آزمون آماری t با سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد.

### نتایج

با توجه به نتایج استفاده از پروبیوتیک پدیوکوکس اسید لاکتیک بر شاخص چاقی، راندمان لاشه، وزن نسبی

آزمایشی مقدار  $10^7$  CFU در گرم خوراک (۱۳)، باکتری پدیوکوکس اسید لاکتیک (Bactocell, CNCM- MA 18.5 M, Lallemand, France) در روغن ماهی مخلوط و به جیره پایه اضافه شد. در جیره شاهد روغن افزوده شده بدون پروبیوتیک است. در آنالیز جیره‌های آزمایشی و شاهد درصد مواد جیره شامل پروتئین خام ۴۰ درصد، چربی خام ۱۵ درصد، فیبر ۳ درصد، خاکستر ۹ درصد، رطوبت ۸ درصد و فسفر ۱/۲۵ درصد بود. در مدت ۸ هفته آزمایش (۵۶ روز)، دمای آب در دامنه ۱۱-۱۳ درجه سانتی‌گراد و تلفات ماهی‌های هر وان به صورت روزانه ثبت شد. در ابتدا و پایان آزمایش پس از بی‌هوشی تمام ماهی‌های با پودر گل میخک (به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش، طول و وزن انفرادی ماهی، شاخص چاقی ماهی با استفاده از رابطه زیر اندازه‌گیری گردید (۱). شاخص رشد ویژه، افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک و شاخص چاقی با استفاده از روابط زیر محاسبه شد.

شاخص رشد ویژه:  $SGR = (Lnw2 - Lnw1) \times 100 / T$

$Lnw1$ : لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی (گرم)

$Lnw2$ : لگاریتم وزن نهایی (گرم)

T: مدت انجام آزمایش (۵۶ روز)

افزایش وزن = وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

ضریب تبدیل غذایی = خوراک مصرفی در طول

دوره پرورشی (گرم) ÷ افزایش وزن ماهی (گرم).

شاخص چاقی:  $K = (W/L^3) \times 100$

W وزن بدن (گرم) و L طول کل بدن (سانتی متر)

در پایان آزمایش از هر وان ۶ ماهی به طور تصادفی انتخاب و پس از خونگیری از ورید ناحیه دمی با سرنگ ۵ سی سی بخشی از خون گرفته شده به لوله‌ی آزمایش و بخش دیگر به لوله‌ی هپارینه منتقل شد. پس از خونگیری، لاشه آماده‌ی پخت و کبد ماهی‌ها با ترازویی با

معنی دار ( $P < 0/05$ ) یافت، اما شاخص‌هایی مانند تری گلیسرید، آلبومین، پروتئین کل و گلوبولین سرم خون و نیز تعداد گلبول‌های قرمز و درصد مونوسیت و لنفوسیت‌ها تحت تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید لاکتیک قرار نگرفت (جدول ۲).

نتایج مورفولوژی روده در جدول ۳ ارائه شده است. طول و ارتفاع پرز روده ماهی‌ها تحت تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید لاکتیک قرار نگرفت اما عرض پرز روده با تغذیه این باکتری افزایش معنی دار یافت ( $P < 0/05$ ).

کبد، خوراک مصرفی تاثیر نداشت اما درصد تلفات ماهی‌ها را کاهش معنی داری ( $P < 0/05$ ) داد، اما افزایش در میانگین وزن نهایی ماهی‌ها و کاهش ضریب تبدیل خوراک از لحاظ عددی با مصرف پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید لاکتیک مشاهده شد (جدول ۱).

اثر تغذیه باکتری پدیوکوکوس اسید لاکتیک بر فراسنجه‌های خونی و هماتولوژیکی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در جدول ۲ ارائه شده است. تعداد گلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، متوسط حجم گلبول‌های قرمز خون تحت تاثیر این باکتری قرار گرفته و افزایش

جدول ۱- اثر باکتری پدیوکوکوس اسید لاکتیک بر عملکرد رشد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

شاخص	شاهد	باکتری پدیوکوکوس اسید لاکتیک	سطح احتمال
وزن اولیه (گرم)	۶۰/۱۷ $\pm$ ۲/۹۸	۶۰/۱۰ $\pm$ ۲/۷۶	۰/۹۸۶
شاخص چاقی اولیه	۱/۲۲ $\pm$ ۰/۰۱۱	۱/۲۶ $\pm$ ۰/۰۲۶	۰/۲۲۴
وزن نهایی (گرم)	۱۴۰/۵۶ $\pm$ ۴/۶۷	۱۴۹/۳۸ $\pm$ ۳/۴۲	۰/۲۱۴
شاخص چاقی نهایی	۱/۳۶ $\pm$ ۰/۰۱۱	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۰۳۲	۰/۸۶۶
وزن نسبی لاشه (درصد)	۸۷/۲۷ $\pm$ ۰/۴۳۶	۸۸/۱۹ $\pm$ ۰/۶۲۲	۰/۲۸۹
وزن نسبی کبد (درصد)	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۰۶۷	۱/۵۱ $\pm$ ۰/۰۸۴	۰/۴۵۱
تلفات (درصد)	۱۶/۳۲ $\pm$ ۲/۸۸۸	۵/۵۲۲ $\pm$ ۱/۰۳۸	۰/۰۲۴
افزایش وزن (گرم/ماهی/روز)	۱/۹۵ $\pm$ ۰/۱۲۲	۱/۹۱ $\pm$ ۰/۰۷۳	۰/۸۱۰
خوراک مصرفی (گرم/ماهی/روز)	۱/۶۱۴ $\pm$ ۰/۱۳۳	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۰۸۷	۰/۴۶۸
ضریب تبدیل خوراک	۰/۸۲ $\pm$ ۰/۰۳۷	۰/۷۷ $\pm$ ۰/۰۲۵	۰/۳۲۳
شاخص رشد ویژه (درصد)	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۰۳۵	۱/۶۲ $\pm$ ۰/۱۱۱	۰/۸۷۶

پروبیوتیک‌ها می‌توان به تولید آنزیم‌هایی مانند آمیلاز و پروتئاز، ویتامین‌ها و اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک اشاره کرد که سبب بهبود عملکرد رشد ماهی می‌شود. علاوه بر این تولید طیف وسیعی از باکتریوسن‌هایی به نام پدیوسین (pediocin) توسط *Pediococcus acidilactici* (۵) و اسیدهای آلی مانند اسید استیک و اسید لاکتیک خصوصیت تقابل با باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد (۷، ۱۱) و سبب مقابله با عوامل بیماری‌زا و بهبود زنده مانی ماهی می‌شود.

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، مشخص شد که باکتری *Pediococcus acidilactici* سبب کاهش درصد تلفات در ماهی قزل آلا می‌شود (جدول ۱). اثر زنده مانی بالاتر در پژوهش دیگری که با ماهی تیلپیا قرمز (*Oreochromis niloticus*) و تغذیه با پروبیوتیک دارای این باکتری ( $10^7$  CFU) در گرم خوراک به مدت ۳۲ روز انجام شد، نیز مشاهده گردید که این بهبود در بقا و نیز تمایل به بهبود عملکرد رشد ماهی مربوط به اثرات سودمند تغذیه‌ای آن و نیز ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا است (۸). از اثرات مهم تغذیه‌ای

جدول ۲= اثر باکتری پدی کوکوس اسید لاکتیک بر هماتولوژی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

فراسنجه (واحد)	شاهد	باکتری پدی کوکوس اسید لاکتیک	سطح احتمال
تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر)	۴۳۱/۱۴ $\pm$ ۱۷/۷۷	۴۲۰/۹۷ $\pm$ ۵۶/۴۶	۰/۸۶۹
آلبومین (گرم در دسی لیتر)	۱/۵۸ $\pm$ ۰/۰۹۷	۱/۵۳ $\pm$ ۰/۰۵۱	۰/۶۱۹
پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	۵/۳۲ $\pm$ ۰/۵۵	۴/۹۳ $\pm$ ۰/۳۵	۰/۵۵۳
گلوبولین (گرم در دسی لیتر)	۳/۷۰ $\pm$ ۰/۴۴	۳/۴۰ $\pm$ ۰/۳۵	۰/۶۰۵
هماتوکریت (درصد)	۴۲/۰۰ $\pm$ ۱۵/۴۷	۳۷/۰۰ $\pm$ ۲/۰۸	۰/۰۹۷
تعداد گلبول‌های قرمز ( $10^6 \times$ در میکرولیتر)	۳/۴۰ $\pm$ ۰/۲۲	۲/۹۸ $\pm$ ۰/۳۰	۰/۳۰۴
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۱۰/۷۴ $\pm$ ۰/۴۰	۱۱/۴۷ $\pm$ ۰/۴۹	۰/۲۸۱
تعداد گلبول‌های سفید ( $10^3 \times$ در میکرولیتر)	۱۴۶۶۲/۵۰ $\pm$ ۷۴۳/۶۸	۱۸۱۷۰/۰۰ $\pm$ ۶۳۷/۴۹	۰/۰۰۰۱
نوتروفیل (درصد گلبول سفید)	۲۰/۰۰ $\pm$ ۱/۰۹	۲۴/۲۵ $\pm$ ۱/۱۰	۰/۰۳۱
لنفوسیت (درصد گلبول سفید)	۷۰/۰۰ $\pm$ ۱/۶۳	۷۰/۸۰ $\pm$ ۱/۴۶	۰/۷۲۸
مونوسیت (درصد گلبول سفید)	۴/۴۰ $\pm$ ۰/۲۴	۳/۸۰ $\pm$ ۰/۳۷	۰/۲۱۶
ائوزینوفیل (درصد گلبول سفید)	۲/۶۰ $\pm$ ۰/۲۴	۲/۸۰ $\pm$ ۰/۳۷	۰/۶۶۶

جدول ۳- اثر باکتری پدی کوکوس اسید لاکتیک بر هیستوپاتولوژی بافت روده ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

نمونه	شاهد	باکتری پدی کوکوس اسید لاکتیک	سطح احتمال
طول پرز (میکرون)	۴۱/۰۰ $\pm$ ۴/۰۴	۳۳/۲۰ $\pm$ ۲/۸۹	۰/۱۴۲
عرض پرز (میکرون)	۱۰/۲۰ $\pm$ ۱/۵۹	۱۶/۰۰ $\pm$ ۱/۱۴	۰/۰۱۸
ارتفاع پرز (میکرون)	۵/۵۷ $\pm$ ۱/۶۰	۴/۰۰ $\pm$ ۰/۵۷	۰/۲۶۴

رشد این ماهی گردید (۴). وجود پاسخ‌های متناقض در اثر استفاده از پروبیوتیک‌ها در ماهی‌ها مربوط به مقدار استفاده، نوع پروبیوتیک، مدت زمان آزمایش و نیز شرایط فیزیولوژیکی، وزن اولیه ماهی و نیز وجود عامل بیماری‌زا دارد. البته نکته‌ای که کمتر به آن توجه شده است ترکیب جیره غذایی است که بایستی در پژوهش‌های آینده مورد توجه قرار گیرد. شاخص‌های هماتولوژیکی به عنوان عوامل با ارزشی در بررسی سلامتی ماهی مطرح هستند (۲۰) و گزارش شده است که تحت تاثیر پروبیوتیک‌ها نیز قرار می‌گیرند (۱۲، ۶) و افزایش گلبول‌های سفید (لوکوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها) در اثر تغذیه ماهی قزل آلا با باکتری *Pediococcus*

افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک و شاخص رشد ویژه ماهی تحت تاثیر خصوصیت پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* قرار نگرفت. عدم تاثیر استفاده از این پروبیوتیک بر عملکرد رشد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با تغذیه باکتری *Pediococcus acidilactici* در پژوهش دیگری نیز نشان داده شده است، به طوری که تغذیه این باکتری با دو غلظت  $10^7$  و  $10^8$  CFU در گرم خوراک، تاثیری بر عملکرد ماهی نشان نداشته که با پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۳). در حالی که استفاده از همین پروبیوتیک در تغذیه ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*) در سطح  $10^8$  CFU در کیلوگرم خوراک سبب بهبود عملکرد

*acidilactici* نشان دهنده بهبود شاخص های ایمنولوژیکی ماهی است (۶،۱۷). افزایش درصد نوتروفیل‌ها با افزایش سیستم دفاعی موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و استرس‌ها گردیده که این امر می‌تواند با افزایش سوخت-وساز موجب کاهش تلفات و افزایش بازماندگی شود (۶). کاهش عددی هماتوکریت در خون ماهی تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده شد که علت واقعی آن مشخص نیست ولی ممکن است مربوط به افزایش سطح لوکوسیت‌ها باشد که به صورت محدود اندازه و تعداد گلبول‌های قرمز (هر چند غیر معنی دار) را کاهش داده و سبب کاهش غیر معنی دار هماتوکریت شده باشد این نتیجه گیری با پژوهش انجام شده با ماهی تیلاپیا قرمز (با وزن اولیه ۱۷۶ گرم) که تعداد گلبول‌های سفید افزایش و هماتوکریت کاهش یافت و نیز سطح آلبومین، پروتئین کل و گلوبولین سرم خون ماهی‌ها پس از ۱۴ روز تغذیه با باکتری *Pediococcus acidilactici* تغییری نشان نداد (۸)، مشابه بود. در پژوهش دیگری با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که تغذیه *Pediococcus acidilactici* نیز سبب افزایش لوکوسیت‌های خون شد (۱۴). علاوه بر این در ماهی گرین ترور نیز تغذیه این باکتری سبب افزایش گلبول‌های سفید خون گردید (۴). افزایش گلبول‌های سفید می‌تواند به عنوان یک واکنش سیستم ایمنی غیر اختصاصی مطرح باشد که انتظار می‌رود این ماهیان دارای مقاومت بیشتری در برابر عوامل استرس‌زا و بیماری‌ها باشند (۹، ۴) و این ممکن است سبب کاهش تلفات در پژوهش اخیر نیز شود. همچنین افزودن پروبیوتیک به جیره‌ی ماهیان باعث کاهش هماتوکریت شده است که پایین بودن میزان آن می‌تواند به عنوان یک پارامتر خونی مثبت باشد زیرا با کوچک

شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آن‌ها در رگ‌های خونی آسان‌تر و سریع‌تر می‌گردد و از لخته شدن جلوگیری می‌کند (۸). نتایج در جدول ۵- نشان داد استفاده از پروبیوتیک در جیره تاثیر معنی‌داری بر طول و ارتفاع پرز روده تاثیر نداشته اما عرض پرز را بهبود بخشید است. معمولاً مهم‌ترین پارامترهای روده ای که برای ارزیابی سلامتی مجرای گوارشی در حیوانات آبی استفاده می‌شوند شامل تراکم و تنوع باکتری‌های وضعیت و تعداد پرزهای روده ایی و اپتلیوم مجرای گوارشی می‌باشند (۲۰). مجرای گوارشی، یکی از رایج‌ترین جایگاه‌های ورود میکروب‌های بیماری‌زاست. برقراری باکتری‌های بیماری‌زا در مجرای گوارشی ممکن است به لایه مخاطی و پرزهای روده آسیب برساند. اندازه بزرگ‌تر پرزهای روده ممکن است منجر به سطح جذب بیشتر و بهبود جذب مواد مغذی شود (۹). نقش مفید *Pediococcus acidilactici* در روده می‌تواند مربوط به ممانعت از ایجاد رقابت با عوامل بیماری‌زا، تولید اسیدهای آلی (۸) و تولید پدیوسین (یک باکتریوسین) (۵) باشد که ایمنی موکوسی حیوان را ارتقا می‌دهد. علاوه بر بهبود دفاع ایمنی و غیر ایمنی حیوان میزبان، سازوکارهایی مقابله با عوامل بیماری‌زا مانند تغییر شرایط محیطی، رقابت در به دست آوردن مواد مغذی و رقابت در مکان‌های برای اتصال و نیز تولید مواد ضد میکروبی همگی موثر می‌باشند (۸).

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با مساعدت و امکانات شرکت فرادانه (تولید کننده خوراک آبزیان) انجام شد که از کمیته تحقیق و توسعه و مدیریت آن به دلیل فراهم آوردن شرایط اجرا قدردانی می‌گردد.



## منابع

10. Flint, J.F., Garner, M.R. (2009). Feeding beneficial bacteria: a natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. *Journal of Applied Poultry Research*, 18; 367–378. 7-
11. Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringø, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod. *Hydrobiologia*, 352; 279–285.
12. Irianto, A., Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25; 333–342.
13. Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B., Davies, S.J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameter of rainbow trout, *Aquaculture Nutrition*, 17; 73-79.
14. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302; 1–18. 13-
15. Mitchell, L.G., Kenworthy, R. (2001). Investigations on a metabolite from *Lactobasillus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *E.coli* for pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 41; 341–351.
16. Nazari Farsani, M., Jalali, S.M.A., Jafarian Dehkordi, M. (2015). Evaluation the meat composition and immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by dietary different oil sources, l-carnitine and ractopamine supplement. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*, 10; 108-1115.
17. Newaj-Fyzul, A., Adesiyunz, A.A., Mutani, A., Ramsudhag, A., Brunt, J., Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103; 1699–1706. 15-
18. Romn, L., Real, F., Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V. (2012). The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology* 33; 1071–1075.
- ۱- احمدیان، ع.، جلالی، س. م. ع.، پوررضا، ج. ۱۳۹۴. اثر منبع روغن و مکمل‌های غذایی ال کارنیتین و راکتوپامین بر عملکرد رشد و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). *مجله علمی شیلات ایران*. دوره ۲۴. شماره ۱. صفحات: ۱۰۹-۱۲۰.
- ۲- جلالی، س. م. ح. ۱۳۸۸. اثرات تغذیه کارنیتین و راکتوپامین بر ماهی قزل آلائی رنگین کمان. رساله دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۰۰ ص.
- ۳- فروزانفر، ع. ۱۳۸۴. تکثیر و پرورش آزاد ماهیان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۵-۳۵.
- ۴- حسینی مدنی، ن.، مورکی، ن.، انوار، س. ا. ع.، منوچهری، ح.، قربانی، م. ۱۳۹۳. اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*). *پاتوبیولوژی مقایسه ای*. سال ۱۱. شماره ۲. صفحات: ۱۲۹۱-۱۳۰۲.
5. Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, F., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2008). *Pediocin SA-1*, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99; 5384–5390.
6. Brunt, J., Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28; 693–701.5
7. Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275; 182–193.
8. Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109; 851 - 862. 8-
9. Firouz bakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K., Jani-Khalili, K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 37; 833-842.

19. Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Roman, L., Grasso, V., Vega, J. (2012). Characterization of the probiotic strain *Vagococcus flvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 155; 369–373. 20-  
20. Svobodova, Z., Fravda, D., Palakova, J. (1991). Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology. Czechoslovakia, 31 pp.

21. Webster, C.D., Lim, C.E. (2002). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, CABI Publishing. Wallingford, Oxon, 418 pp.

22. Yarahmadi, P., Kolangi Miandare, H., Hoseinifar, S.H. (2016). Haemato immunological and serum biochemical parameters, intestinal histo morphology and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary fermentable fibre (Vitacel®). *Aquaculture nutrition*, 22; 1134–1142.

. ۱ .



Archive of SID



# Effects of *Pediococcus acidilactici* as a Probiotic on Hematology, Blood Parameters and Intestinal Histopathology of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*

Kh. Ataei, S.M.A. Jalali, F. Yadolahi, A. Hematzadeh

Faculty of Agriculture and Natural Resources, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Fish.nutritionist@gmail.com

Received: 2018.30.6

Accepted: 2018.27.10

## Abstract

**Introduction & Objective:** Nonpathogenic lactic acid bacteria have important role on intestinal microbial flora of animal host and they improve performance of fish by influencing gastrointestinal tract, reducing pH and improving immunity. An experiment was designed to study the physiological effects of *Pediococcus acidilactici* feeding on rainbow trout.

**Material and Methods:** The ninety six rainbow trout with 60 g initial body weight were randomly assigned to six polyethylene tanks and fed by control or experimental diet which was contain  $10^9$  CFU.Kg<sup>-1</sup> *Pediococcus acidilactici* for 8 weeks feeding trials at three times daily feeding rate. The growth performance, final body weight, efficiency of carcass and liver, hematology and blood parameters and intestinal morphology of fish were evaluated at end of experiment.

**Results:** The body weight gain, feed conversion ratio, final body weight, condition factor, efficiency of carcass and liver weren't affected by the dietary supplementation of *Pediococcus acidilactici*, as probiotic, .but significantly reduced mortality of fish ( $p < 0.05$ ). The number of white blood cells, percent of neutrophils and also width of intestinal villus increased by feeding *Pediococcus acidilactici*.

**Conclusion:** The supplementation of *Pediococcus acidilactici* to fish diets improved immunity and reduced mortality of grower rainbow trout.

**Keywords:** Probiotic, Physiology, Rainbow Trout