Archive of SID

مقایسه تأثیر باکتری‌های دارای توان پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* بر میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **امین رنجبر***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **مهرزاد مصباح**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **محمدرضا تابنده**: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **تکاور محمدیان**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **داریوش غریبی**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵
- **مجتبی علیشاهی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، صندوق‌پستی: ۱۳۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌منظور ارتقای ایمنی‌زایی و مقاومت در برابر بیماری‌ها افزایش یافته است. در این تحقیق باکتری‌های با توان پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس پلنتاروم (در دو گروه با سه تکرار) به‌مدت ۶۰ روز به غذای ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان اضافه شدند. ماهی‌های به غذای یک گروه از ماهی‌ها (با سه تکرار) که به‌عنوان گروه شاهد درنظر گرفته شده بود پروبیوتیک افزوده نشد. در پایان دوره، ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر میزان رشد و آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از ۶۰ روز، ماهی‌هایی که در رژیم غذایی خود دارای پروبیوتیک بودند، افزایش معنی‌داری از نظر میزان رشد ویژه (SGR)، میزان کارآیی پروتئین (PER) و درصد افزایش وزن (BWG) نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($p<0/05$). ضریب تبدیل غذایی (FCR) در گروه شاهد بالاتر از دو گروه دیگر بود و اختلاف معنی‌داری با آن‌ها داشت ($p<0/05$). در پایان این دوره، میزان آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و تریپسین نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان دادند ($p<0/05$) ولی آلکالین فسفاتاز و پروتئاز اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$). از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلنتاروم و لاکتوباسیلوس پنتوسوس می‌تواند تاثیر مشخصی در میزان رشد و افزایش آنزیم‌های گوارشی و کمک به هضم اجزای غذایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک،لاکتوباسیلوس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، آنزیم‌های گوارشی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ar_dvm_2@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهم‌ترین ماهی‌های پرورشی سردابی کشور است که متاسفانه بروز برخی بیماری‌ها و مشکلات بهداشتی ازجمله بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس موجب بروز خسارات و زیان‌های اقتصادی فراوانی به صنعت پروش آن‌ها شده است (Soltani و همکاران، ۲۰۰۹). با افزایش مصرف آبزیان در جهان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات ایجاد شده، بیماری‌ها هستند. آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک استراتژی سنتی برای مدیریت بیماری‌های آبزیان و افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی استفاده شده‌اند. آنتی‌بیوتیک درمانی می‌تواند منجر به ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم، باقی‌ماندن دارو در بافت‌های ماهی و مشکلات زیست‌محیطی شود. از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی که دارای اثرات مفیدی بر سلامتی موجود هستند، می‌گردند. هم‌چنین باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در محصولات ماهی برای مصرف انسان می‌تواند مضر باشد. با ایجاد ممنوعیت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای آبزیان خوراکی، استراتژی‌های دیگر با زیان کم‌تر مورد توجه قرار گرفتند. از طرفی استفاده از واکسن‌ها نیز برای ماهی‌های نابالغ غیرقابل انجام بوده، هم‌چنین در ماهی‌های بزرگ‌تر پرهزینه و استرس‌زا می‌باشند. هم‌چنین گستره وسیع عوامل بیماری‌زا در محیط پرورش ماهی باعث محدود شدن تأثیرات واکسن می‌شود. بنابراین نیاز به‌روش‌های جایگزین، به‌خوبی احساس می‌شود (رحمتی و همکاران، ۱۳۸۹؛ ضیایی نژاد، ۱۳۸۲). از جمله مواردی که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از پروبیوتیک (Probiotic) است. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان سلول‌های زنده یا سوبستراهایی هستند که فوایدی برای میزبان از طریق افزایش رشد، بهبود هضم غذا، مقاومت در برابر بیماری‌ها و بالا بردن سطح ایمنی دارند (Kesarcodi-Watson و همکاران، ۲۰۰۸؛ Tuan و همکاران، ۲۰۱۳). در سال‌های اخیر علاقه پرورش‌دهندگان به استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک محرک ایمنی و جلوگیری از بیماری‌ها، نسبت به روش‌های درمانی و کنترل‌کننده قدیمی مانند دارو درمانی یا واکسن‌ها بیش‌تر شده است (Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۳؛ Dimitroglou و همکاران، ۲۰۱۱). پروبیوتیک‌های کاربردی برای آبزیان پرورشی شامل باکتری‌های اسیدلاکتیک (LABs)، باکتری‌ها باسیلوسی، ویبریوها و مخمرها هستند (Daniels و همکاران، ۲۰۱۰). دستگاه گوارش دارای سیستم پیچیده‌ای است که علاوه بر نقش کلیدی در هضم، جذب و تنظیم اسمزی، در دفاع از میزبان در برابر حملات آنتی‌ژن‌ها و عوامل بیماری‌زای خارجی نقش دارد (Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۳ ؛ Ringø و همکاران، ۲۰۰۷؛ Birkbeck و همکاران، ۲۰۰۵). موکوس ترشح شده از سلول‌های جامی شکل روده، pH، وجود آنزیم‌های گوارشی و صفرا و بافت لنفوئیدی وابسته به روده (GALT) می توانند در ایجاد یک محیط مناسب علیه عوامل بیماری‌زا باشند (Mulder و همکاران، ۲۰۰۷؛ Dalmo و همکاران،۱۹۹۷؛ Ellis و همکاران ۲۰۰۱؛ Doggett و همکاران، ۱۹۸۷). هم‌چنین وجود باکتری‌های مفید در روده می‌تواند باعث تولید محصولات مهار کننده فعالیت بیماری‌زاها و یا رقابت با جایگزینی عوامل بیماری‌زا، جلوگیری از بیان ژن‌های خطرناک و افزایش بیان ژن‌های ایجادکننده پاسخ ایمنی و کمک به عملکرد هضمی روده شود (Pérez-Sánchez و همکاران، ۲۰۱۱؛ Irianto و همکاران، ۲۰۰۲؛ Merrifield و همکاران، ۲۰۱۰؛ Pérez و همکاران، ۲۰۱۰). از آن‌جایی‌که آنزیم‌های دستگاه گوارش یک شاخص مهم در چگونگی عملکرد هضمی و جذبی مواد غذایی است، بررسی وضعیت آن‌ها از اهمیت بالایی می‌تواند برخوردار باشد. در ماهی‌ها، آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، آمیلاز و لیپاز که به‌ترتیب در هضم پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها دخالت دارند و هم‌چنین آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) که در هضم، جذب و انتقال مواد غذایی نقش مهمی دارد، از اهمیت بالاتری برخوردارند. در بررسی‌های محققین تاثیرات مواد محرک ایمنی بر روی میزان بیان ژنی یا میزان فعالیت این آنزیم‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (Zhao و همکاران، ۲۰۱۲). با افزایش پرورش متراکم آبزیان، چگونگی ترکیبات غذایی مورد استفاده آن‌ها اهمیت بیش‌تری پیدا کرده است. یکی از مواردی که امروزه به‌منظور بهبود عملکرد فرمول غذایی آبزیان به‌کار می‌رود، پروبیوتیک‌ها هستند. میکروارگانیسم‌های مختلفی به عنوان پروبیوتیک برای موجودات آبزی به‌کار می‌روند، ولی باکتری‌های لاکتیک اسید (LABs) مهم‌ترین پروبیوتیک‌ها برای آبزیان هستند (Talpur و همکاران، ۲۰۱۳؛ Vendrell و همکاران، ۲۰۰۸؛ Aly و همکاران، ۲۰۰۸؛ Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اثرات مفیدی را بر سلامتی و بازماندگی به‌وسیله رشد جمعیت میکروبی سودمند در دستگاه گوارش دارند. هم‌چنین استفاده از پروبیوتیک‌ها، موجب جلوگیری و کنترل بیماری‌های آبزیان از طریق کاهش عوامل بیماری‌زا با اثر آنتاگونیستی خود در کسب مکان‌های استقرار در دستگاه گوارش می‌گردند (Korkea-aho و همکاران، ۲۰۱۲؛ Askarian و همکاران، ۲۰۰۸). از دیگر عملکردهای مفید پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی، افزایش محصولات تخمیری، اصلاح دریافت مواد معدنی و بهبود جذب مواد غذایی اشاره کرد (Ringø و Gatesoupe، ۱۹۹۸). هم‌چنین پروبیوتیک‌ها باعث تحریک اشتها و فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌گردند (Tovar-Ramırez و همکاران، ۲۰۰۴).

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طورکه‌مشخص‌است،پروبیوتیک‌هامی‌توانند موجب افزایش میزان رشد، بهبود جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی موجودات شوند. لذا در این تحقیق، توان پروبیوتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* استفاده شده در تغذیه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان، بر روی فاکتورهای رشد، میزان بازماندگی و آنزیم‌های روده‌ای درشرایط درون تنی (in vivo) موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی غذا: جهت آماده‌سازی باکتری‌های با توان پروبیوتیکی و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. هر کدام از باکتری‌ها به‌طور جداگانه در محیط آب‌گوشت در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه) جداسازی و شستشو شده و به‌کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها بر روی 3×10^{9} CFU/ml تنظیم گردید. سپس ۱/۶۶ میلی‌لیتر از سوسپانسون سرم فیزیولوژی حاوی باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus pentosus* به‌طور جداگانه به ۱۰۰ گرم غذا اضافه گردید که در نهایت هرکدام از پروبیوتیک‌ها با غلظت 5×10^{7} CFU/ml به هر گرم غذا اسپری شدند. پس از آن، از غذاهای تهیه شده، جهت بررسی صحت عملیات، نمونه‌برداری شد و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گرفت. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل به‌همان میزان اسپری گردید (Mohammadian و همکاران، ۲۰۱۶؛ Planas و همکاران، ۲۰۰۴؛ Vine و همکاران، ۲۰۰۶).

تیماربندی و دوره آزمایش ماهی‌ها: تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن حدود ۲۰ تا ۳۰ گرم تهیه شد و تحت شرایط مناسب به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال یافت. برای انجام این مطالعه تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی به ۳ گروه (تیمار) و هر گروه تشکیل شده از ۳ تکرار ۲۵ قطعه‌ای، در مخازن ۳۰۰ لیتری مجزا با دمای ۲±۱۶ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن ۹ میلی‌گرم بر لیتر و pH=۷ تقسیم و به مدت ۶۰ روز نگه‌داری شدند. محدوده طول کل و وزن اولیه ماهی‌ها به‌ترتیب ۱۸/۲-۱۴/۳ سانتی‌متر و ۳۲/۹-۱۹/۰۸ گرم بود. در تغذیه یک تیمار از باکتری با توان پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (*L. plantarum*) و در تیمار دیگر *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* (*L. pentosus*) استفاده شد و در تیمار شاهد نیز پروبیوتیکی وجود نداشت.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: زیست‌سنجی و شاخص‌های رشد تیمارهای مورد آزمایش در روزهای صفر و ۶۰ براساس رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شد (Salas و همکاران، ۲۰۱۰):

میزان رشد ویژه یا Specific growth rate (SGR):

$$\%SGR = \frac{Ln W_f - Ln W_i}{t_2 - t_1} \times ۱۰۰$$

Wf: وزن نهایی (گرم)، Wi: وزن اولیه (گرم)، (t2 – t1) : تعداد روزهای آزمایش

ضریب تبدیل غذایی یا Feed Conversion ratio (FCR):

$$FCR = \frac{F}{W_f - W_i}$$

FCR: ضریب تبدیل غذایی، F: غذای مصرفی (وزن خشک به گرم)

میزان کارآیی پروتئین یا Protein efficiency ratio (PER):

$$PER = \frac{BW_f - BW_i}{AP}$$

BWf: وزن نهایی (گرم)، BWi: وزن اولیه (گرم)، AP: پروتئین مصرفی (گرم)

درصد میزان بقاء یا Survival rate% (SR):

Survival rate = (Nt/N0) × 100

Nt= تعداد ماهی‌ها در انتهای دوره آزمایش، N0= تعداد ماهی‌ها در ابتدای دوره آزمایش

درصد افزایش وزن بدن یا Body weight growth (BWG):

%BWG= BWf - BWi/ BWi × 100

%BWG: درصد افزایش وزن بدن، BWf: وزن نهایی (گرم)، BWi: وزن اولیه (گرم)

فاکتورهای وضعیت یا Condition factors (CF):

$CF= (W/L^3)\times ۱۰۰$

CF: شاخص کیفیت، W: وزن ماهی (وزن تر به گرم)، L: طول ماهی (سانتی‌متر)

ارزیابی تأثیر باکتری‌های با توان پروبیوتیکی بر آنزیم‌های گوارشی: برای این منظور از دستگاه گوارش ماهی‌ها (۳ قطعه از هر تکرار)، در روزهای صفر و ۶۰ نمونه‌گیری شد. ماهی‌ها به‌روش قطع نخاع آسان‌کشی شده و در مجاورت یخ قرار داده شدند تا با حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت پذیرد (Chang و همکاران ۲۰۰۲). روده‌ها جهت اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی، بلافاصله در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (تانک ازت مایع) نگه‌داری شدند (Kuzmina و همکاران، ۲۰۱۰). جهت ارزیابی تأثیر باکتری‌های با توان پروبیوتیکی بر آنزیم‌های گوارشی فعالیت ۵ آنزیم آلفا-آمیلاز (Bernfeld، ۱۹۵۱؛ Worthington، ۱۹۹۱)، تریپسین (Erlanger و همکاران، ۱۹۶۱)، آلکالین‌فسفاتاز (Cahu و همکاران، ۱۹۹۹؛ Crane و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۹۷۹)، لیپاز (Worthington، ۱۹۹۱) و پروتئاز (Worthington، ۱۹۹۱) مورد سنجش قرار گرفت.

تهیه عصاره آنزیمی: برای ساخت بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی(تریپسین، آلفا- آمیلاز و لیپاز)، بافر هموژن (Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد با pH=۷/۸) استفاده شد. نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از تانک ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت g ۰/۰۰۱ توزین گردیدند و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به‌داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. به نسبت ۱ به ۹ (وزنی- حجمی) محلول بافر هموژن بر روی نمونه‌ها ریخته شد. سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی Heidolph instrument, German هموژن شدند، نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به‌داخل اپندورف‌ها ریخته شد و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (Rungruangsak Torrissen و همکاران، ۲۰۱۲). برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول ۵۰ میلی‌مولار، بافر-HCl Tris ۲ میلی‌مولار در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ (وزنی- حجمی) استفاده گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد. پس از هموژن کردن نمونه‌ها در این بافر، کلرید کلسیم ۰/۱مولار به هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیمی استفاده شد (Cahu و همکاران، ۱۹۹۹؛ Daniels و همکاران، ۲۰۱۰).

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: فعالیت ۵ آنزیم گوارشی آلفا- آمیلاز، تریپسین، لیپاز، آلکالین فسفاتاز و پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جایی‌که آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و در دسته پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، لذا محاسبات فعالیت آنزیمی براساس پروتئین محلول انجام گردید. برای تعیین فعالیت آنزیم ترپسین، از سوبسترای N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N- بنزوئیل-L - آرژنین تبدیل می‌شود. سپس در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت نوری نتایج صورت گرفت. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰ میکرولیتر از اسیدکلریدریک ۱ میلی‌مولار مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به‌میزان ۳۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۵۳ نانومتر انجام شد (Erlanger و همکاران، ۱۹۶۱). برای تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایشی و ۲۵۰ میکرولیتر به‌عنوان کنترل وارد شد. سپس عمل انکوباسیون به‌مدت ۴-۳ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا به دمای تعادل برسند. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل انکوباسیون دقیقاً به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها در حمام آب جوش قرار گرفتند، سپس از حمام خارج شده و در دمای اتاق خنک شدند. ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شد و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری انجام شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به‌دست آمد. واحد فعالیت آلفا -آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. (Bernfeld، ۱۹۵۱؛ Worthington، ۱۹۹۱). برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. بدین‌منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر Tris-Hcl ۰/۸مولار، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ میلی‌مول و معرف تیمو لفتالئین ۰/۹٪ استفاده شد (Worthington، ۱۹۹۱). جهت سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت آلکالین فسفاتاز (شرکت زیست شیمی) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بی‌کربنات را با یک قسمت محلول معرف پارانیترو فنیل فسفات (۰/۱ مولار) مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هم‌دمایی صورت گیرد. میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از این مخلوط را با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا انکوبه شود. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول ۱ گرم بر لیتر سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. 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 شد (Cahu و همکاران، ۱۹۹۹؛ Crane و همکاران، ۱۹۷۹). جهت سنجش آنزیم پروتئاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده شد در این روش از کازئین به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای اندازه‌گیری آنزیم پروتئاز ۲ عدد لوله آزمایش، ۱ عدد برای آزمایش و ۱ لوله هم جهت بلانک مشخص گردید و به هر لوله ۰/۰۵ میلی‌لیتر کازئین و ۱۰ میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

$Cacl_2$ اضافه شد و سپس به لوله آزمایش ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید ولی به لوله بلانک چیزی اضافه نشد. سپس لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، و پس از این زمان به هرکدام از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۵٪ اضافه کرده و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از این زمان ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی جدا گردید و سپس به هر لوله ۱ میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه شد و در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید (Worthington، ۱۹۹۱). برای سنجش غلظت پروتئین محلول، نمونه‌های هموژن شده به‌روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد. به این منظور از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. در این روش ۲۰ میکرولیتر نمونه، ۴۰ میکرولیتر محلول برادفورد و ۱۴۰ میکرولیتر آب مقطر با هم مخلوط شده و در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (Bernfeld، ۱۹۵۱).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها، از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<0/05$ درنظر گرفته شد.

نتایج

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: در جدول ۱، میزان شاخص‌های رشد اندازه گیری شده ماهی‌هایی که از پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* به‌مدت ۶۰ روز تغذیه کرده بودند و گروه شاهد که فاقد هرگونه پروبیوتیکی بوده نشان داده شده است. درصد میزان بقا (SR) در تمام تیمارها پس از گذشت ۶۰ روز از پرورش ۱۰۰٪ بود و تفاوتی بین گروه‌های حاوی پروبیوتیک با گروه شاهد وجود نداشت. میزان درصد افزایش وزن بدن (BWG) و میزان رشد ویژه(SGR) در گروه دارای *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* با گروه حاوی *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($p>0/05$) ولی بین تیمار *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* با شاهد اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). مقادیر بالاتر فاکتورهای وضعیت (CF)، به‌ترتیب در تیمار شاهد، تیمار *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* و تیمار *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* دیده شد که بین هر سه گروه اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<0/05$). بالاترین میزان ضریب تبدیل غذایی (FCR) در گروه شاهد مشاهده شد که با دوگروه دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$) درحالی‌که بین دو گروه حاوی پروبیوتیک اختلاف معنی‌دار دیده نشد ($p\geq0/05$). در مورد میزان کارایی پروتئین (PER) بیش‌ترین مقدار در تیمار *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* دیده شد که البته این مقدار با تیمار *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$) ولی بین این دو تیمار با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار بود ($p\leq0/05$). بیش‌ترین میزان ضریب افزایش وزن روزانه(DWG) به‌ترتیب در تیمارهای *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*، *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و شاهد وجود داشت که اختلاف معنی‌داری بین هر سه گروه دیده شد ($p<0/05$).

جدول ۱: شاخص‌های رشد ماهی‌هایی که از پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* به‌مدت ۶۰ روز تغذیه کرده‌اند

فاکتور رشد / تیمارها	SR (٪)	BWG (٪)	CF (٪)	SGR (٪)	FCR (٪)	PER (٪)	DWG (٪)
گروه *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*	۱۰۰٪	۷۷/۳±۶۹/۴^{ab}	۰/۰±۷۷/۰۶^{b}	۰/۰±۴۲/۰۱^{ab}	۰/۰±۶۰/۰۱^{b}	۳/۰±۹۹/۰۳^{a}	۰/۰±۴۲^{a}
گروه *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*	۱۰۰٪	۱۲۲/۳۲±۹۶/۳^{a}	۰/۰±۵۸/۰۱^{c}	۰/۰±۵۷/۱۱^{a}	۰/۰±۶۵/۱۱^{b}	۳/۰±۷۸/۵۶^{a}	۰/۰±۳۳/۰۵^{b}
گروه شاهد	۱۰۰٪	۴۵/۱۱±۲۴/۶^{b}	۱/۰±۰۴/۰۲^{a}	۰/۰±۲۷/۰۶^{b}	۲/۰±۲۷/۵۰^{a}	۱/۰±۰۸/۲۳^{b}	۰/۰±۱۹/۰۴^{c}

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون هستند.

تأثیر باکتری‌های با توان پروبیوتیکی بر آنزیم‌های گوارشی: در جدول ۲، میزان آنزیم‌های گوارشی به‌دست آمده از آزمایشات انجام شده بر روی روده ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده در روز صفر و ۶۰ پرورش با غذاهای حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد که فاقد پروبیوتیک بوده‌اند، آمده است. به‌ترتیب، ماهی‌های تیمارهای حاوی پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* در روز ۶۰ پرورش بیش‌ترین مقادیر آنزیم‌های تریپسین، آمیلاز و لیپاز را داشتند که مقادیر به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد روز ۶۰ و همه تیمارهای روز ۳۰ داشتند ($p\leq0/05$). مقادیر آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و پروتئاز با این‌که در روز ۶۰ پرورش به‌ترتیب در تیمارهای حاوی *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* بیش‌ترین بودند ولی با دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($p>0/05$). بیش‌ترین میزان افزایش آنزیم در روز ۶۰ نسبت به روز صفر در مورد آنزیم‌های آمیلاز و تریپسین مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این تحقیق میزان درصد بقا (SR) در تمام گروه‌های مورد مطالعه در طول ۶۰ روز ۱۰۰٪ به‌دست آمد که این امر نشان‌دهنده این است که شرایط نگه‌داری در تمام گروه‌های پرورشی ماهی‌های قزل‌آلا مناسب بوده است. در این مطالعه دیده شد دو گروهی از ماهی‌ها که به‌مدت ۶۰ روز از غذای حاوی باکتری‌های با توان پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* استفاده کرده‌اند نسبت به گروه شاهد که فاقد مواد پروبیوتیکی افزودنی بود از نظر فاکتورهای رشد مورد بررسی (BWG، CF، SGR، FCR، PER و DWG)، دارای شاخص‌های رشد بهتری بودند. Arabzadeh و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر پروبیوتیک نغذیه‌ای پروتکسین (Protexin) که مخلوطی از باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* بود را بر روی میزان بقا و رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. گروه‌های تغذیه شده از پروبیوتیک دارای بهبود مشخصی در میزان FCR، SGR و PER بعد از ۱۰ هفته از دوره پرورش بودند. Naseri و همکاران (۲۰۱۳)، اثرات نسبت‌های مختلف پروبیوتیک تجاری حاوی *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* به‌همراه یون آهن را بر روی رشد و میزان بقای قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه آن‌ها WG و SGR در ماهی‌هایی که از جیره‌های حاوی پروبیوتیک استفاده کرده بودند به‌طور معنی‌داری افزایش را نشان داده بود ($p<0/05$).

جدول ۲: میزان آنزیم‌های گوارشی در روده ماهی‌ها تغذیه شده با باکتری‌های دارای توان پروبیوتیکی در روز صفر و ۶۰ نشان داده شده است

	آنزیم	تریپسین (واحد/میکروگرم پروتئین)	آمیلاز (واحد/میکروگرم پروتئین)	لیپاز (واحد/میکروگرم پروتئین)	آلکالین فسفاتاز (واحد/میکروگرم پروتئین)	پروتئاز (واحد/میکروگرم پروتئین)
	باکتری					
روز صفر	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	۷/۷۱±۲/۸ ^{c}	۰/۰۸۶±۰/۰۳ ^{b}	۱/۴۲±۰/۴۸ ^{b}	۰/۰۳۲±۰/۰۲۰ ^{a}	۰/۰۸۴±۰/۰۳۴ ^{a}
	لاکتوباسیلوس پنتوسوس	۸/۷۱±۱/۹ ^{c}	۰/۰۶۹±۰/۰۳ ^{b}	۱/۰۹±۰/۱۴ ^{b}	۰/۰۳۴±۰/۰۱۲ ^{a}	۰/۰۸۱±۰/۰۲۳ ^{a}
	گروه شاهد	۸/۶۳±۲/۶۵ ^{c}	۰/۰۸۴±۰/۰۱ ^{b}	۱/۰۷±۰/۲۶ ^{b}	۰/۰۳۶±۰/۰۱۷ ^{a}	۰/۰۸۶±۰/۰۳۷ ^{a}
روز ۶۰	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	۳۵/۹۷±۱۱/۱ ^{b}	۰/۵۸۰±۰/۲۵ ^{a}	۱۰/۶۴±۰/۹۷ ^{a}	۰/۰۳۷±۰/۰۰۳ ^{a}	۰/۱۰۱±۰/۰۳۹ ^{a}
	لاکتوباسیلوس پنتوسوس	۷۳/۶۸±۷/۵ ^{a}	۰/۸۰۶±۰/۲۵ ^{a}	۱۱/۴۰±۲/۴۰ ^{a}	۰/۰۳۷±۰/۰۱۳ ^{a}	۰/۱۲۳±۰/۰۶۱ ^{a}
	گروه شاهد	۱۰/۷۸±۵/۲ ^{c}	۰/۰۸۵±۰/۰۱ ^{b}	۲/۰۳±۰/۹۶ ^{b}	۰/۰۳۴±۰/۰۰۷ ^{a}	۰/۰۹۸±۰/۰۳۶ ^{a}

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون هستند.

Bagheri و همکاران (۲۰۰۸)، وضعیت رشد، میزان بقا و جمعیت میکروبی روده نوزادان قزل‌آلای رنگین‌کمان را که در رژیم غذایی آن‌ها از پروبیوتیک تجاری حاوی *Bacillus spp* بود بررسی کردند. میزان جمعیت باکتریایی روده تیمارهایی که از پروبیوتیک استفاده کرده بودند به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد (فاقد پروبیوتیک) بود ($p<0/05$). در این تیمارها، میزان SGR، CF و PER به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد بیش‌تر و میزان FCR نیز به شکل معنی‌داری از گروه شاهد کم‌تر بودند ($p<0/05$). آن‌ها بیان داشتند این یافته‌ها می‌توانند نشان‌دهنده افزایش قابلیت هضم غذا و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی‌ها دریافت‌کننده پروبیوتیک بوده باشد. قلجایی‌فرد و همکاران (۱۳۹۳)، تاثیر خوراکی باکتری اسیدلاکتیک *Lactobacillus plantarum* (KC426951) جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد ، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار دادند. براساس نتایج به‌دست آمده بیان کردند که این باکتری برای بهبود این فاکتورها می‌تواند نقش به‌سزایی داشته باشد. Doos Ali Vand و همکاران (۲۰۱۴)، اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* را بر روی فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شیربت (*Barbus grypus*)، مورد بررسی قرار دادند. مطالعات آن‌ها نشان دادند که تغذیه خوراکی این پروبیوتیک به‌مدت ۶۰ روز باعث تأثیر معنی‌دار در بهبود SGR و FCR نسبت به گروه شاهد شده است. در مطالعه انجام شده توسط Giri و همکاران (۲۰۱۳)، *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* در ۳ غلظت به رژیم غذایی ماهی‌های *Labeo rohita* اضافه شده است. آن‌ها میزان WG و SRG را با افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد در روز ۶۰ پرورش به‌دست آورده‌اند. کاظمی و همکاران (۱۳۹۳)، تأثیر پروبیوتیک باکتوسل (دارای باکتری *Pedicoccus acidolacti*) را بر فاکتورهای رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. آن‌ها در پایان دوره پرورش میزان FCR را بین ۱/۴۷-۰/۷۸ به‌دست آوردند که بین تیمارهای دارای پروبیوتیک با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). کم‌ترین میزان SGR را در این مطالعه ۰/۹۶ به‌دست

www.SID.ir

Archive of SID

آوردند که مربوط به گروه شاهد بودو بادیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). مشاهده می‌شود که در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در زمینه افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی آبزیان بهبود در شاخص‌های رشد وجود داشته است که نتایج آن‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی‌دارد. پروبیوتیک‌هامی‌توانندموجب افزایش جمعیت میکروبی دستگاه گوارش شوند (Birkbeck و همکاران، ۲۰۰۵) و از طرفی افزایش جمعیت میکروبی در روده می‌تواند باعث افزایش فعالیت‌های آنزیمی و تولید بیش‌تر ویتامین‌ها گردد که این موارد در بهبود وضعیت رشد، سلامت و تغذیه ماهی‌ها مؤثرند (Wache و همکاران، ۲۰۰۶).

سنجش سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب برای مقایسه میزان رشد ماهی‌ها، میزان پذیرش غذا و هم‌چنین ظرفیت گوارشی ماهی‌ها باشد. در این مطالعه، نتایج حاصل از تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در ماهی قزل‌آلا برای مدت ۶۰ روز، نشان داد که استفاده از هر دو پروبیوتیک موجب افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در میزان آنزیم‌های تریپسین، آمیلاز و لیپاز شده است. دلیل آن ممکن است به‌خاطر ترشح محدوده وسیعی از آنزیم‌های ترشح شده توسط باکتری‌های پروبیوتیکی (اگزوآنزیم‌ها) و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی‌ها (اندوآنزیم‌ها) باشد (Suzer و همکاران، ۲۰۰۸). درحالی‌که در این مطالعه با وجود افزایش میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و پروتئاز در گروه‌های دارای پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد که فاقد پروبیوتیک بودند، این اختلاف معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). Essa و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات استفاده از پروبیوتیک‌های مختلف (ازجمله *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*) در رژیم غذایی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) را به‌مدت ۶۰ روز بر روی میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) مورد بررسی قرار دادند. در تحقیقات آن‌ها مشخص شد که میزان رشد در تمام گروه‌های تغذیه کننده از پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است و هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم‌ها در دستگاه گوارش به‌جز در مورد ماهی‌های تغذیه شده از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* افزایش معنی‌داری را نشان داد که با این مطالعه هم‌خوانی داشت. البته در این بررسی میزان افزایش یافته برای آنزیم آمیلاز نسبت به گروه شاهد، معنی‌دار گزارش شده درحالی‌که برای پروتئاز و لیپاز معنی‌دار نبوده است. بیش‌ترین افزایش در هر سه آنزیم در مطالعه آن‌ها مربوط به تیماری بود که از *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* تغذیه شده بودند. Marlida و همکاران (۲۰۱۴) تاثیر باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از دستگاه گوارش هامور ماهی پانتر (*cormileptes altivelis*) را بر روی فاکتورهای رشد و میزان آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها میزان هرسه آنزیم نسبت به گروه‌شاهدافزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) که نتایج آن‌ها با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌خوانی داشت. آن‌ها بیان کردند که استفاده از پروبیوتیک می‌تواند موجب افزایش توانایی دستگاه گوارش این ماهی‌ها در هضم بهتر ذرات غذایی مانند نشاسته، چربی و پروتئین و درنتیجه افزایش میزان رشد آن‌ها شده باشد. Doos Ali Vand و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آنزیم‌های گوارشی (لیپاز، α-آمیلاز، کیموتریپسین، تریپسین و آلکالین فسفاتاز) را مورد مطالعه قرا دادند. بالاترین میزان تریپسین به‌دست آمده توسط آن‌ها در روز ۳۰ آزمایش، به‌میزان ۱۰۸ CFU/g بود که با گروه شاهد و دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشته است. مقدار آلکالین فسفاتاز در روز ۳۰ و ۶۰ در گروه‌های پروبیوتیک با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نداشته است (p>۰/۰۵). میزان α-آمیلاز در روزهای ۳۰ و ۶۰، در گروه‌های دارای پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است (p>۰/۰۵) با این‌که در روز ۶۰ افزایش را نشان داده بود. فعالیت آنزیم لیپاز در روز ۳۰ و در گروه حاوی ۱۰۸ CFU/g بیش‌ترین میزان را داشته است ولی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشته است (p>۰/۰۵). در مطالعه آن‌ها میزان بقای ماهی‌ها بعد از گذشت ۶۰ روز در همه گروه‌ها ۱۰۰٪ بوده‌است. این‌افزایش در تولید آنزیم‌های گوارشی توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌خاطر وجود ترکیبات ناشناخته در رژیم غذایی ماهی‌ها حاوی پروبیوتیک باشد که باعث تحریک رشد و تولید آنزیم‌های گوارشی اگزوژن می‌شوند و درنهایت باعث افزایش میزان آنزیم‌های گوارشی در ماهی‌های حاوی پروبیوتیک در جیره غذایی شوند. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه و بررسی‌های دیگر محققین نشان داده است که رابطه مستقیمی بین میزان افزایش آنزیم‌های گوارشی با بهبود فاکتورهای رشد ماهی‌ها وجود داشته است. میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به مراحل رشد، میزان غذای مصرفی، ساختار شیمیایی و احتیاجات غذایی آبزیان وابسته باشد (Ahmadnia و همکاران، ۲۰۱۱). وجود اختلاف معنی‌دار در میزان آنزیم‌های تریپسین، لیپاز و α-آمیلاز بین گروه‌های دارای پروبیوتیک با گروه شاهد، ممکن است به‌علت توانایی ساخت این آنزیم‌های اگزوژن توسط پروبیوتیک‌های‌استفاده شده در این آزمایش و یا تحریک کافی سیستم گوارشی برای ساخت این آنزیم‌ها باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که‌استفاده از دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* و *لاکتوکوکوس پنتوسوس* به‌عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان، می‌تواند تأثیر مشخصی در افزایش میزان آنزیم‌های گوارشی به‌خصوص تریپسین، آمیلاز و لیپاز و هم‌چنین افزایش میزان رشد داشته باشد. پیشنهاد می‌شود که در آینده بر روی تأثیر دیگر باکتری‌های با توان پروبیوتیکی بر روی رشد، میزان بقا و مقادیر آنزیم‌های گوارشی مطالعات بیش‌تری انجام گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. **رحمتی‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۸۹.** افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* با استفاده از لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۳۳ تا ۴۰.

۲. **ضیایی‌نژاد، س.، ۱۳۸۲.** بررسی تأثیر باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیم‌های گوارشی در مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی (*Fenneropeaneus indicus*). طرح تحقیقاتی دانشگاه زابل.

۳. **قلجایی‌فرد، ا.؛ خارا، ح. و شناورماسوله، ع.، ۱۳۹۵.** اثر باکتری *Lactobacillus plantarum* (KC426951) جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی لاشه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات. دوره۵، شماره ۲، صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۴.

۴. **کاظمی، ا.؛ راستیان‌نسب، ا.؛ گندمکار، ح.؛ مهدوی، ج. و محمودی، ر.، ۱۳۹۵.** تاثیر پروبیوتیک باکتوسل بر برخی فاکتورهای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال ۸، شماره ۱، صفحات ۲۱۵ تا ۲۲۲.

۵. **Ahmadnia, H.R.; Farhangi, M.; Rafiee, G.H.; Noori, F. and Safari, O., 2011.** Effects of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on digestive enzyme activities in *Artemia urmiana*. Asian-Pacific Aquaculture Conference. Kochi, India. pp: 17-20.

۶. **Aly, S.M.; Abdel-Galil Ahmed, Y.; Abdel-Aziz Ghareeb, A. and Mohamed, M.F., 2008.** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol. Vol. 25, pp: 128-136.

۷. **Arabzadeh, P.; Javadi, A.; Mirzaei H. and Khatibi, S.A., 2011.** Effect of Dietary Probiotic on Survival and Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Advances in Environmental Biology. Vol. 5, No. 6, pp: 1162-1165.

۸. **Askarian, F.; Matinfar, A.; Kousha, A.; Bahmani, M.; Khorshidi, K.; Shenavar, A. and Ringø, E., 2008.** Diversity or Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of Reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*): A Comparative Study. Journal of Fisheries & Aquatic Science. Vol. 3, No. 5, pp: 302-311.

۹. **Bagheri, T.; Hedayati, S.A.; Yavari, V.; Alizade, M. and Farzanfar, A., 2008.** Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 8, pp: 43-48.

۱۰. **Bernfeld, P., 1951.** Amylases α and β. In methods in enzymology, vol.1 (Colowick, P & Kaplan, N.O., eds). New York: Academic press. pp: 149-157.

۱۱. **Birkbeck, T.H. and Ringo, E., 2005.** Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), Microbial Ecology in Growing Animal. Elsevier, Edinburgh, UK. pp: 208-234.

۱۲. **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. Vol. 72, pp: 248-254.

۱۳. **Cahu, C.L.; Zambonino Infante, J.L.; Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., 1999.** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchus labrax larvae. Aquaculture. Vol. 171, pp: 109-111.

۱۴. **Cerezuela, R.; Meseguer, J. and Ángeles Esteban, M., 2013.** Effects of dietary inulin, Bacillus subtilis and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 34, pp: 843-848.

۱۵. **Chang, A.S.C.; Hashim, R.; Chow-Yang, L. and Ali, A.B., 2002.** Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish, *Symphysodon aeguifasciata*. Aquaculture. Vol. 203, pp: 321-333.

۱۶. **Crane R.K.; Boge G. and Rigal A., 1979.** Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. Vol. 554, pp: 264-267.

۱۷. **Dalmo R.A.; Ingebrigtsen K. and Bøgwald J., 1997.** Non specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). J Fish Dis. Vol. 20, pp: 241-273.

۱۸. **Daniels, C.L.; Merrifield, D.L.; Boothroyd, D.P.; Davies, S.J.; Factor, J.R. and Arnold, K.E., 2010.** Effect of dietary Bacillus spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut Microbiota. Aquaculture. Vol. 304, No. 1-4, pp: 49-57.

۱۹. **Dimitroglou A.; Merrifield D.L.; Carnevali O.; Picchietti S.; Avella M. and Daniels C., et al., 2011.** Microbial manipulations to improve fish health and production a Mediterranean perspective. Fish Shellfish Immunol. Vol. 30, pp: 1-16.

۲۰. **Doggett A. and Harris J.E., 1987.** The ontogeny of the gut-associated lymphoid tissue in Oreochromis mossambicus. J Fish Biol, 31:23-7.

۲۱. **Doos Ali Vand, Z.; Alishahi, M. and Tabandeh, M.R., 2014.** Effects of different levels of Lactobacillus

www.SID.ir

Archive of SID

۲۲. **Ellis A.E., 2001.** Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev Comp Immunol. Vol. 25, pp: 827-839.

۲۳. **Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys. Vol. 95, pp: 271-278.

۲۴. **Essa, M.A.; El-Serafy, S.S.; El-Ezabi, M.M.; Daboor, S.M.; Esmael, N.A. and Lall, S.P., 2010.** Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 5, No. 2, pp: 143-161.

۲۵. **Giri, S.S.; Sukumaran, V. and Oviya, M., 2013.** Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 34, No. 2, pp: 660-666.

۲۶. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. J Fish Dis. Vol. 25, pp: 633-642.

۲۷. **Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J. and Gibson, L., 2008.** Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. Vol. 274, pp: 1-14.

۲۸. **Korkea-aho, T.; Papadopoulou, A.; Heikkinen, J.; Von Wright, A.; Adams, A.; Austin, B. and Thompson, K., 2012.** Pseudomonas M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. Journal of Applied Microbiology. Vol. 113, pp: 24-35.

۲۹. **Kuz'mina, V.; Shekovtsova, N. and Bolobonina, V., 2010.** Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biology Bulletin. Vol. 37, pp: 605-611.

۳۰. **Marlida, R.; Agus Suprayudi, M. and Widanarni, Harris, E., 2014.** Isolation, selection and application of probiotic bacteria for improvement the growth performance of humpback grouper (*Cormileptes altivelis*). International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR). volume 16, No 1, pp 364-379.

۳۱. **Merrifield D.L.; Dimitroglou A.; Foey A.; Davies S.J.; Baker R.T.M. and Bøgwald J, et al., 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture. Vol. 302, 118 p.

۳۲. **Mohammadian, T.; Alishahi, M.; Tabandeh, M.R.; Ghorbanpoor, M.; Gharibi, D.; Tollabi, M. and Rohanizade, S., 2016.** Probiotic effects of Lactobacillus plantarum and L. delbrueckii ssp. bulguricus on some immune-related parameters in Barbus grypus. Aquaculture International. pp: 1-18.

۳۳. **Mulder, I.E.; Wadsworth, S. and Secombes, C.J., 2007.** Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during infection with Aeromonas salmonicida. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 23, pp: 747-759.

۳۴. **Naseri, S.; Khara, H. and Shakoori, M., 2013.** Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) frys, Journal of Applied Animal Research. Vol. 41, No. 3, pp: 318-325.

۳۵. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.; Salminen, S. and Bylund, G., 2001.** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture. Vol. 198, pp: 229-236.

۳۶. **Pérez, T.; Balcázar, J.L.; Ruiz-Zarzuela, I.; Halaihel, N.; Vendrell, D. and de Blas, I., 2010.** Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. Mucosal Immunol. Vol. 4, pp: 355-360.

۳۷. **Pérez-Sánchez, T.; Balcázar, J.l.; Merrifield, D.L.; Carnevali, O.; Gioacchini, G.; de Blas, I. and Ruiz Zarzuela, I., 2011.** Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 31, pp: 196-201.

۳۸. **Planas, M.; Vazquez, J.A.; Marques, J.; Peres-Lomba, R.; Gonzalez M.P. and Murado, M., 2004.** Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture. Vol. 240, pp: 313-329.

۳۹. **Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. Vol. 160, pp: 177-203.

۴۰. **Ringø, E.; Myklebust, R.; Mayhew, T. and Olsen, R., 2007.** Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. Aquaculture. Vol. 268, pp: 251-64.

۴۱. **Rungruangsak-Torrissen, K.; Rustad, A.; Sunde, J.; Eiane, S.A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J.; Nygrd, E.; Samuelsen, T.A.; Mundheim, H.; Luzzana, U. and Venturini, G., 2002.** In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. J Sci Food Agric. Vol. 82, pp: 644-654.

۴۲. **Salas-Leiton, E.; Anguis, V.; Martín-Antonio, B.; Crespo, D.V.; Planas, J.; Infante, C.; Cañavate, J. and Manchado, M., 2010.** Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 28, pp: 296-302.

۴۳. **Soltani, M.; Mousavi, H.A. and Mirzargar, S., 2009.** Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran, 1th international congress on aquatic animal, Islamic Republic of Iran, Tehran. pp: 27-28.

۴۴. **Suzer, C.; Coban, D.; Kamaci, H. O.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuoglu, O. and Kucuksari, H., 2008.** Lactobacillus casei as probiotic on growth performance and digestive enzymes activity of Barbus gryprus. International Journal of Bioscience. Vol. 4, No. 7, pp: 106-116.

www.SID.ir

Archive of SID

spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. Vol. 280, pp: 140-145.

۴۵. **Talpur, A.D.; Ikhwanuddin, M.; Abdullah, M.D.D. and Ambok Bolong, A.M., 2013.** Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. Aquaculture. Vol. 416, pp: 173-178.

۴۶. **Tovar-Ramırez, D.; Zambonino Infante, J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F. and Vázquez-Juárez, R., 2004** Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture. Vol. 234, pp: 415-427.

۴۷. **Tuan, T.; Duc, P. and Hatai, K., 2013.** Review Article: Overview of the use of probiotics in aquaculture. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture. Vol. 3, No. 3, pp: 89-97.

۴۸. **Vendrell, D.; Luis Balcázar, J.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. and Luis Múzquiz, J., 2008.** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. Vol. 31, pp: 337-345.

۴۹. **Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S., 2008.** Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. Biotechnology. Vol. 7, No. 1, pp: 124-128.

۵۰. **Vine, N. G.; Leukes, W.D.; Kaiser, H.; Daya, S.; Baxter, J. and Hecht, T., 2004.** Competition for attachment of aquaculrue candidate probiotic and pathogenic bacaetia on fish interstinal mucus. Journal of fish disease. Vol. 27, pp: 319-326.

۵۱. **Wache, Y.; Auffray, F.; Gatesoupe, F.J.; Zambonino, J.; Gayet, V.; Labbe, L. and Quentel, C., 2006.** Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture. Vol. 258, pp: 470-478.

۵۲. **Worthington, C.C., 1991.** Worthington.manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold, New Jerse. pp: 80-85.

۵۳. **Zhao, J.; Liu, Y.; Jiang, J.; Wu, P.; Chen, G.; Jiang, W.; Li, S.; Tang, L.; Kuang, S.; Feng, L. and Zhou, X., 2012.** Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture. pp: 117-128.

www.SID.ir