Archive of SID

اثرات تغذیه‌ای پروبوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های هضمی و میزان مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)

- **سینا جوانمردی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **کامران رضایی‌توابع***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **سعید مرادی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **لیلاسادات بیات‌غیاثی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۷

چکیده

با توجه به این‌که باکتری (*Aeromonas hydrophila*) یکی از عوامل بیماری‌زا عمده در پرورش آبزیان آب‌شیرین محسوب می‌گردد، در تحقیق حاضر با هدف دستیابی به راهکاری جهت بهبود عملکرد رشد و هم‌چنین سطح ایمنی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا، ٤ گروه ماهی تیلاپیا *O. niloticus* با وزن اولیه ١٦ گرم، به‌مدت ٦٠ روز توسط جیره‌هایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس(*Lactobacillus rhamnosus*) تغذیه شدند و در پایان پس از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی روده، تحت تزریق باکتری آئروموناس هیدروفیلا قرار گرفتند و پس از بروز کامل بیماری، شاخص‌های خونی نیز مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار را در تیمار ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره دارا بود. به‌علاوه فعالیت آنزیم تریپسین در تیمار ۳ و آنزیم آمیلاز در تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود ($P<0/05$). یک هفته پس از تزریق باکتری نیز آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینوترانسفراز موجود در سرم خون در تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره، در مقایسه با سایر تیمارها کم‌تر بود ($P<0/05$) و بقا در این تیمارها به‌ترتیب نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد استفاده از ۲ تا ۳ گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در هر کیلوگرم جیره ماهی تیلاپیای نیل می‌تواند عملکرد رشد و ایمنی را به شکل قابل توجهی افزایش دهد.

کلمات کلیدی: ایمنی غیراختصاصی، *Aeromonas hydrophila*، *Lactobacillus rhamnosus*، افزایش وزن، آنزیم پروتئاز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: krtavabe@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باتوجه‌به پیش‌بینی سازمان غذا و کشاورزی جهانی، مصرف آبزیان خوراکی تا سال ۲۰۳۰ به ۱۴۶ میلیون تن در سال افزایش خواهد یافت (FAO، ۲۰۰۸). در دهه اخیر صنعت آبزی‌پروری سریع‌ترین رشد را در بخش تولید پروتئین حیوانی داشته است. در این ارتباط، تولید جهانی ماهیان خوراکی در سال ۲۰۱۴ به‌میزان ۷۳/۸ میلیون تن رسید که نسبت به سال ۲۰۱۳ به‌میزان ۵/۱ درصد افزایش داشت (FAO، ۲۰۱۶). درمیان گونه‌های پرورشی، تیلاپیا دومین ماهی از نظر میزان پرورش در سراسر جهان است و تولید آن طی دهه گذشته به‌دلیل استفاده از آن در سیستم‌های گوناگون آبزی‌پروری، قابلیت فروش و بازارپسندی بالا، رشد سریع، مقاومت بالا در برابر تغییرات شرایط فیزیکوشیمیایی آب و قیمت بازار پایدار، چهار برابر شده است. محبوبیت تیلاپیا نزد مصرف‌کنندگان به‌دلیل قیمت ارزان، آماده‌سازی و پخت آسان وطعم ملایم آن به‌وجود آمده است (Wang و LU، ۲۰۱۶). در بین گونه‌های مختلف تیلاپیا، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) به‌دلیل عملکرد رشد بهتر و مقاومت بیش‌تر به بیماری‌ها، از بعد پرورش گونه مهم‌تری تلقی می‌شود و میزان پرورش آن در سطح جهانی بیش‌تر است (Abd El-Rhman و همکاران، ۲۰۰۹). سیستم‌های تولید متراکم ماهی می‌توانند انواع مختلف استرس مزمن را تحت عوامل محیطی برای ماهی ایجاد کنند که بر روی پایداری فیزیولوژیک، سرعت رشد، عملکرد تولیدمثل و سیستم ایمنی بدن در جهت تولید ماهی‌هایی مستعدتر برای بیماری اثرگذار هستند (Telli و همکاران، ۲۰۱۴). به‌طوری که بهبود عملکرد ماهی و مقاومت به بیماری در آبزیان پرورشی، از جمله چالش‌های عمده‌ای می‌باشد که پرورش‌دهندگان همواره با آن مواجه‌هستند. علاوه براین، بیماری‌های باکتریایی یکی از عوامل محدود کننده برای پرورش ماهی، از جمله تیلاپیای نیل می‌باشد (abdel-Tawwab و همکاران، ۲۰۰۸). درمیان عوامل مسبب بیماری‌های باکتریایی، آئروموناس‌های متحرک به‌خصوص آئروموناس هیدروفیلا بسیار موردتوجه می‌باشد. آئروموناس‌ها باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت و متعلق به خانواده آئرومونادا‌سه هستند. آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری فرصت‌طلب می‌باشد و تحت شرایط استرس‌زا از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری و یا کاهش کیفیت آب تبدیل به یک پاتوژن می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). درهمین راستا ساخت غذاهای باکیفیت و محتوای پروتئینی بالا از جهت تامین مواد مغذی ضروری مورد نیاز ماهی و هم‌چنین وجود افزودنی‌هایی جهت حفظ سلامت و رشد اقتصادی ماهی نیز ضروری می‌باشد (Lara-Flores و همکاران، ۲۰۰۳). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی مواد شیمیایی دیگر به‌عنوان محرک رشد و ضد باکتری در بالا بردن سلامت موجود و کارایی تغذیه انجام گردیده است اما به‌دلیل اثرات باقی‌مانده در آبزیان و عدم رغبت مصرف‌کنندگان استفاده از آن‌ها در تولید آبزیان توصیه نمی‌شود (ایمان‌پور و همکاران، ۱۳۹۴). اما در دهه گذشته، پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)، به‌عنوان یک افزودنی غذایی به‌طور گسترده‌ای برای محافظت از ماهی در برابر عفونت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند و از آن‌جایی‌که موجب بهبود پاسخ ایمنی علیه پاتوژن‌های مضر می‌شوند، در حال حاضر استفاده از این پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش ایمن و جایگزینی برای کنترل بیماری‌های ماهی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Pirarat و همکاران، ۲۰۰۶). با توجه به اثر بخشی مفید پروبیوتیک‌ها به جهات مختلف به‌خصوص در رابطه با حفظ فلور طبیعی دستگاه گوارش از طریق حذف رقابتی و افزایش تعداد باکتری‌های مفید، تغییر در متابولیسم از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و کاهش فعالیت آنزیم باکتریایی پاتوژن، بهبود فرایند هضم و جذب و از بین بردن انتروتوکسین‌ها و تحریک سیستم ایمنی (Giannenas و همکاران، ۲۰۱۵)، هدف از انجام این مطالعه استفاده از افزودنی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به‌منظور بهبود فراسنجه‌های رشد و سیستم ایمنی ماهی تیلاپیای نیل به‌عنوان دو شاخص اصلی تاثیرگذار بود که جهت موفقیت در امر پرورش آبزیان صورت می‌پذیرد.

مواد و روش‌ها

مواد و شرایط آزمایش: جهت انجام یک‌دوره آزمایش ۶۰ روزه، تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی تیلاپیای نیل ۱۶ گرمی از یکی از مراکز تکثیر و پرورش آبزیان واقع در استان البرز تهیه گردید و به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انتقال داده شد. ماهی‌ها پس از بررسی‌های ظاهری و اطمینان از سلامت ظاهری به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به‌مدت یک‌هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس نگه‌داری شدند. پس از پایان دوره سازگاری، ماهی‌ها به‌طور تصادفی میان ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری تقسیم شدند (هرمخزن ۲۰ قطعه ماهی). این ۱۲ گروه آزمایشی شامل ۴ تیمار ۰ (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم خوراک با ۳ تکرار بود که سطوح مختلف پروبیوتیک در تیمارهای مختلف بعد از محاسبه دقیق با توجه به دستورالعمل شرکت تولیدکننده (زیست‌یار وارنا، ایران) بر روی خوراک ماهیان افشانه گردید. پروبیوتیک مورداستفاده در این تحقیق لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*L. rhamnosus*) تجاری با حداقل ۹×۱۰^{۶} سلول زنده باکتری به‌ازای هر گرم بود. منبع اولیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا از ماهی تیلاپیای نیل بیمار شده توسط این

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری برداشت گردید و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (مدل TSB شرکت سیگما) کشت گردید و ۱۲ ساعت جهت رشد و تکثیر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت پس از آن محیط کشت حاوی باکتری به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۵۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، فاز مایع خارج شد و رسوب جامد باکتری توسط محلول بافر فسفات نمکی شستشو و برداشت گردید. غلظت باکتری در محلول نهایی توسط روش طیف سنجی اندازه‌گیری شد و تا رسیدن به غلظت ۵×۱۰^{۷} باکتری در میلی‌لیتر رقیق‌سازی صورت پذیرفت. پس از پایان دوره ۶۰ روزه آزمایش و اندازه‌گیری عملکرد رشد و میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول باکتریایی به حفره شکمی ماهیان تزریق گردید و پس از این‌که بیماری به‌حداکثر قدرت بروز خود رسید شاخص‌های خونی سنجش گردید (Ardo و همکاران، ۲۰۰۸). میزان تعویض آب روزانه هر مخزن ۱۰ درصد بود درحالی‌که دمای آب در طول دوره آزمایش توسط آبگرمکن ترموستات‌دار بر روی ۲۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و اکسیژن محلول، شوری و pH در طول آزمایش به‌ترتیب ۵/۹ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۳ گرم بر لیتر و ۶/۸ بود. ماهی‌ها روزانه ۶ درصد وزن بدنشان توسط جیره ماهیان گرمابی شرکت تولید غذای حیوانات فرادانه (۳۷ درصد پروتئین، ۹ درصد چربی و ۷ درصد فیبر) غذادهی می‌شدند که این غذادهی به شکل دو نوبت در روز (۶:۳۰ و ۱۸:۳۰) صورت می‌پذیرفت.

روش‌های سنجش

عملکرد رشد و بقاء: در پایانه دوره ۶۰ روزه آزمایش، غذادهی برای مدت ۲۴ ساعت متوقف گردید و پس از آن تمام ماهیان هر مخزن برداشت شدند و به آزمایشگاه تکثیر آبزیان گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند. جهت آرام‌سازی به‌مدت ۵ دقیقه در محلول ۴ گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند. در انتها وزن و طول تمام ماهی‌ها اندازه‌گیری شد و عملکردهای رشد و بازماندگی توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

= درصد افزایش وزن (گرم)

۱۰۰×[میانگین وزن اولیه/ (میانگین وزن اولیه–میانگین وزن نهایی)]

= ضریب رشد ویژه (درصد در روز)

تعداد روزها / (لگاریتم طبیعی وزن نهایی–لگاریتم طبیعی وزن اولیه) × ۱۰۰

گرم غذای خورده شده / گرم افزایش وزن = ضریب تبدیل غذایی

گرم افزایش وزن / گرم پروتئین دریافتی =ضریب کارایی پروتئین

۱۰۰ × (تعداد اولیه ماهیان / تعداد نهایی ماهیان) = درصد بقا

میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده: جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده، در انتهای دوره آزمایش ۴ قطعه ماهی از هر مخزن برداشت گردید و مطابق با قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی معدوم گردید (۲۰ ثانیه قرارگیری در محلول ۹۰ گرم بر لیتر پودر گل میخک). سپس سریعاً عمل تشریح آغاز شد و قسمتی از اواسط روده هر ماهی جداسازی گردید. نمونه‌ها با مقدار کافی محلول نمکی ۰/۸ درصد جهت به‌دست آوردن ترکیب ۱۰ درصد وزنی همگن شدند. ترکیب حاصله با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین به‌روش Hummel (۱۹۹۵)، لیپاز به‌روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) و آمیلاز به‌روش Refstie و همکاران (۲۰۰۶) محاسبه گردید.

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: در انتهای دوره آزمایش از هر مخزن ۱۴ قطعه ماهی برداشت و به هرکدام ۰/۱ میلی‌لیتر محلول باکتری آئروموناس هیدروفیلا که در سطح مورد نظر (۵×۱۰^{۷} باکتری در میلی‌لیتر) در سرم فیزیولوژی محلول گردیده بود، به شکل داخل صفاقی تزریق شد. جهت اندازه‌گیری پروتئین کل، گلوکوز، آنزیم آلکالین فسفاتاز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز، ۷۲ ساعت پس از تزریق، ماهیان دریافت‌کننده باکتری (بیمار) و ماهیان دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی (شاهد) به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲۰ گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خونگیری از ساقه دمی توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انجام شد. نمونه‌ها پس از ۶ ساعت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس لایه سرم توسط سمپلر از روی نمونه‌ها برداشته شد. نمونه‌های سرم توسط دستگاه سنجش‌گر خودکار شاخص‌های بیوشیمیایی (شرکت هیتاچی، ژاپن) و کیت‌های تجاری (شرکت پارس آزمون، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. کورتیزول نیز به‌روش الیزا توسط کیت‌های تجاری (شرکت آی‌بی‌ال، آلمان) اندازه‌گیری شد.

تحلیل‌های آماری: نرمال بودن داده‌ها پیش از انجام آنالیز واریانس توسط آزمون کلموگروف– اسمیرنوف بررسی شد و سپس با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA با سطح معنی‌داری ($P\geq ۰/۰۵$) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین بین تیمارها استفاده شد. تمام داده‌های موجود در این مقاله به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه گردید و جهت انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS ۲۴ استفاده گردید.

نتایج

عملکرد رشد و بقا: پس از ۶۰ روز تغذیه ماهی‌ها توسط جیره‌هایی حاوی ۰ (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در هر کیلوگرم جیره غذایی، عملکردهای رشد و درصد بقاء ماهیان ارائه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (جدول ۱). وزن نهایی در ماهیان تغذیه شده با جیره ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا، به‌شکل معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($P<0/05$). درحالی‌که درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در تیمارهای شاهد و ۱ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$). اما در تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا به‌ترتیب به شکل معنی‌داری افزایش یافت. ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا به نسبت تیمار ۲ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا تغییری نداشت اما در مقایسه با تیمارهای شاهد و ۱ به‌شکل معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین ضریب تبدیل پروتئین و درصد بقا تحت تاثیر هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نداشت.

جدول ۱: عملکرد رشد و درصد بقا ماهی تیلاپیای نیل تحت تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره غذایی

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	درصد افزایش وزن	ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	ضریب تبدیل غذایی	ضریب کارایی پروتئین	درصد بقا
شاهد	۰/۰۱±۱۶/۰۴	۰/۲۱±۴۹/۲۴^{a}	۱۵/۹۲±۲۰۶/۹۸^{a}	۰/۰۹±۱/۸۶^{a}	۰/۱۵±۱/۲۴^{b}	۰/۲۶±۲/۳۹	۲/۸۸±۹۸/۳۳
۱	۰/۰۵±۱۶/۰۹	۱/۹۲±۴۸/۹۲^{a}	۱۹/۶۱±۱۰۴/۰۳^{a}	۰/۰۵±۱/۸۵^{a}	۰/۰۹±۱/۲۹^{b}	۰/۱۴±۲/۳	۵/۷±۹۶/۶۶
۲	۰/۰۲±۱۶/۰۷	۳/۳±۵۴/۵۵^{a}	۲۲/۶۳±۲۳۹/۴۵^{b}	۰/۱۱±۲/۰۳^{b}	۰/۰۹±۱/۲^{ab}	۰/۵±۲/۴۴	۱۰۰
۳	۰/۰۱±۱۵/۹۶	۲/۱۸±۶۲/۴۷^{b}	۱۸/۳۸±۲۹۱/۴۱^{c}	۰/۱±۲/۲۷^{c}	۰/۱۳±۱/۱۱^{a}	۰/۲±۲/۴۸	۲/۸۸±۹۶/۶۶

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($P<0/05$).

فعالیت آنزیم‌های هضمی: دوره ۶۰ روزه تغذیه ماهیان توسط جیره حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس تغییراتی را در میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های هضمی روده به‌وجود آورد (شکل ۱). فعالیت آنزیم تریپسین در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا، به‌شکل معنی‌داری از سایر گروه‌ها بیش‌تر بود، درحالی‌که فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین و لیپاز تحت تاثیر هیچ‌یک از تیمارها تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز در تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذا، به‌شکل معنی‌داری از سایر گروه‌ها بیش‌تر بود.

جدول ۲: شاخص‌های خونی و درصد بقا ماهی تیلاپیای نیل تحت تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره غذایی (۷ روز پس از تزریق باکتری)

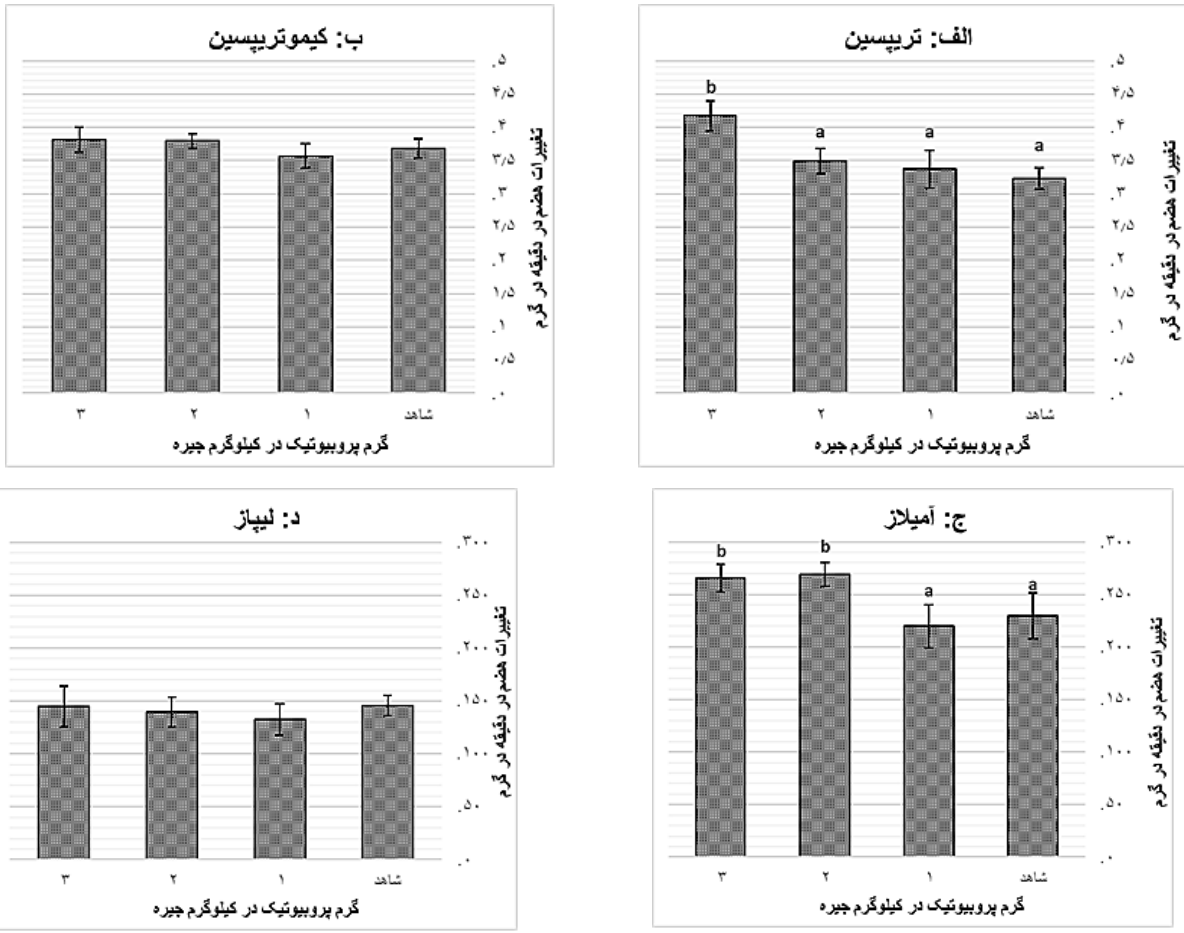
تیمارها	پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر)	گلوکوز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کورتیزول (میکروگرم بر دسی‌لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد بر لیتر)	آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بر لیتر)	آلانین آمینوترانسفراز (واحد بر لیتر)	درصد بقا
شاهد	۰/۲۹±۵/۷۳	۰/۴۷±۱۰۱/۹۳^{b}	۳۰/۲۸±۲۰۹/۰۳^{b}	۰/۷۵±۱۵/۱۷^{b}	۱/۷۳±۳۸/۵۵	۱/۹۳±۴۱/۲۹^{b}	۱۰/۹۱±۴۰/۴۷^{a}
۱	۰/۰۵±۵/۷۴	۰/۶۲±۷۰/۹۲^{a}	۲۹/۲±۲۱۱/۱۷^{b}	۱/۰۹±۱۴/۹۶^{b}	۲/۱۹±۳۶/۳۴	۲/۴۴±۳۹/۸۱^{b}	۷/۱۴±۴۲/۸۵^{a}
۲	۰/۱۶±۵/۸۵	۱/۸۲±۶۷/۳۸^{a}	۲۵/۶۸±۱۹۸/۶۳^{b}	۰/۹۲±۱۰/۰۴^{a}	۰/۹±۳۹/۴۱	۲/۱۷±۲۳/۰۳^{a}	۴/۱۲±۵۹/۵۲^{b}
۳	۰/۲۱±۵/۵۹	۰/۴۱±۶۴/۸۲^{a}	۱۸/۳±۱۷۷^{a}	۱/۲۵±۹/۶^{a}	۴/۸۸±۳۸/۱۳	۴/۰۶±۲۲/۸۷^{a}	۱۰/۹۱±۶۶/۶۶^{c}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($P<0/05$).

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: ماهیانی که به‌مدت ۶۰ روز با جیره حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس تغذیه شده بودند ۷ روز پس از مواجهه با مقدار برابر باکتری بیماری‌زا آئروموناس هیدروفیلا، پاسخ‌های خونی مختلفی را نشان دادند (شکل ۱) به‌گونه‌ای که اگرچه محتوای پروتئین کل و آسپارتات آمینوترانسفراز در سرم خون در بین تمام گروه‌ها بدون تغییر بود، اما گلوکوز سرم در تیمار شاهد به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود و کورتیزول نیز در تیمار ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره در مقایسه با سایر تیمارها کاهش یافت میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای شاهد و ۱ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره به نسبت تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره به شکل معنی‌داری بیش‌تر بود. شمارش تعداد تلفات حاصل از بیماری توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که تیمارهای شاهد و ۱ از نظر درصد بقا بی‌تفاوت بودند اما در تیمارهای ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره، درصد بقا به‌ترتیب به‌شکل معنی‌داری افزایش یافت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: نمودار میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده ماهی تیلاپیای نیل تحت تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره غذایی

حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P<0/05$)

بحث

استفاده از گونه‌های پروبیوتیکی گوناگون در جیره غذایی آبزیان به‌عنوان افزودنی خوراکی، در دو دهه اخیر با افزایش چشمگیری از سوی پرورش‌دهندگان روبرو بوده است (Balcázar و همکاران، ۲۰۰۶). پروبوتیک‌ها اغلب با نشستن بر سطح داخلی روده از طریق ترشح مواد آنزیمی گوناگون و یا رقابت با سایر ریزجانداران بیماری‌زا جهت بقا، جذب مواد غذایی و مقاومت در برابر ریزجانداران بیماری‌زا را افزایش می‌دهند (Nayak، ۲۰۱۰). در راستای آگاهی از اثرات متنوع پروبیوتیک‌های گوناگون بر روی آبزیان، نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل می‌تواند وزن نهایی، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه را افزایش دهد. این یافته‌ها با نتایج محمدی و همکاران (۱۳۹۰) در سنجش عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس و پودر سیاه‌دانه مطابقت داشت که نشان می‌دهد پروبیوتیک مذکور هم در ماهیان سردابی و هم در ماهیان گرمابی به شکل مناسبی در فلور روده ساکن می‌گردد و اعمال اثر می‌کند. در تحقیقی دیگر قربانی‌رنجبری و قربانی‌رنجبری (۱۳۹۲) اعلام داشتند که استفاده توام از کنجاله کانولا و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در جیره لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز باعث بالا رفتن میزان افزایش وزن می‌گردد که بیانگر این حقیقت است که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در سنین لاروی نیز اثر سودمندی را بر جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داراست، از طرفی افزایش بقا در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که با توجه به حساسیت بیش‌تر در سنین لاروی احتمالاً اثر پروبیوتیک مذکور بر زنده‌مانی ماهی‌ها نمایان‌تر است. هم‌چنین ضریب کارایی پروتئین در هیچ‌یک از تحقیقات فوق تغییر معنی‌داری را نشان نداد و می‌توان نتیجه گرفت که حضور پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در جیره و متعاقب آن در فلور روده ماهی، تاثیر قابل توجهی در هضم و جذب پروتئین‌ها توسط ماهی ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

در تحقیق حاضر نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده شامل تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز و آمیلاز پس از یک دوره ۶۰ روزه تغذیه ماهی تیلاپیای نیل با جیره حاوی سطوح‌مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس گویای این مطلب بود که به‌جز افزایش فعالیت آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز در روده، استفاده از این پروبیوتیک در جیره، تاثیر چندانی بر میزان فعالیت سایر آنزیم‌های هضمی روده ندارد. مطالعه Yanbo و Zirong (۲۰۰۶) بر روی استفاده از باکتری‌های خانواده باسیلوس به‌عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در روده را نشان داد، درحالی‌که میزان فعالیت آنزیم لیپاز نیز با افزایش روبرو بود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد و احتمالاً دلیل این عدم تطابق تفاوت در رژیم‌غذایی ماهی تیلاپیای نیل و کپور معمولی و گرایش بیش‌تر ماهی کپور معمولی به جیره‌های گیاهی می‌باشد. باکتری باسیلوس در جیره میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) نیز تاثیری مشابه با کپور معمولی داشت و باعث افزایش هم‌زمان فعالیت آنزیم‌های هضمی‌لیپاز و آمیلاز در روده شد (Ziaei-Nejad و همکاران، ۲۰۰۶). در سنین لاروی نیز افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوسی به جیره غذایی لارو ماهی شانک اروپایی (*Sparus aurata*) باعث افزایش فعالیت آنزیم هضمی آمیلاز و تریپسین در هفته دوم و سوم بعد از تفریخ شد (Suzer و همکاران، ۲۰۰۸) که این نتایج با توجه به لاکتوباسیلوسی بودن پروبیوتیک مصرفی، با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تطابق کامل دارد.

بررسی شاخص‌های سرم خون ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس، ۷ روز پس از تزریق باکتری بیماری‌زا آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که محتوای پروتئین کل سرم خون پس از مواجهه کامل ماهی با بیماری، در هیچ‌کدام از تیمارهای سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره، تغییرات معنی‌داری نداشته است که این نتایج هم‌خوانی کامل داشت با نتایج حاصل از تحقیقی تحت عنوان اثرات استفاده از گیاهان گوناگون بومی کشور چین در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی در هنگام مواجهه با عفونت آئروموناس هیدروفیلا (Ardó و همکاران، ۲۰۰۸) و در تحقیق مذکور نیز محتوای پروتئینی سرم خون ماهی تحت اثر هیچ‌یک از افزودنی‌های غذایی، در هنگام مواجهه با باکتری بیماری‌زا آئروموناس هیدروفیلا تغییر نکرد. این‌گونه به‌نظر می‌رسد که عفونت آئروموناس هیدروفیلا محتوای پروتئینی سرم خون را درگیر نمی‌کند و از طرفی دیگر این شاخص خونی تحت تاثیر مستقیم استفاده خوراکی ماهی از پروبیوتیک و سایر افزودنی‌های گیاهی قرار ندارد.

با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به جیره ماهی تیلاپیای‌نیل، پس‌از بیماری‌ماهی‌توسط‌باکتری آئروموناس هیدروفیلا، میزان کورتیزول و گلوکوز موجود در سرم خون ماهی به شکل معنی‌داری کاهش یافت که می‌تواند مبین این موضوع باشد که در گروه شاهد (بدون پروبیوتیک در جیره) اثر بیماری قوی‌تر ظاهر شده و ماهی بیش‌تر درگیر عفونت شده و متعاقباً دچار استرس بیش‌تری گردیده است که این استرس باعث ترشح کورتیزول به خون و به‌دنبال آن بر اثر افزایش سطح کورتیزول در خون، شکستن گلیکوژن کبدی و آزادسازی کلوگوز به خون شده است. بنابراین این‌گونه برداشت می‌گردد که سطح پایین‌تر کورتیزول و گلوکوز در تیمارهای تغذیه شده‌با پربیوتیک‌به‌این دلیل است‌که‌تغذیه‌با‌پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس با افزایش ایمنی باعث شده ماهی تیلاپیای نیل کم‌تر درگیر عفونت گردد و از نظر شرایط استرسی در حالت بهتری باشد، که این افزایش ایمنی با استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل در برابر عفونت ادواردسیلا تاردا (*Edwardsiella tarda*) نیز گزارش داده شد (Pirarat و همکاران، ۲۰۰۶).

Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) نیز بیان داشتند که استفاده تغذیه‌ای از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند به شکل معنی‌داری محتوای لیزوزیم موجود در خون و در نتیجه ایمنی بدن را در برابر بیماری‌ها افزایش دهد و از طرفی طی یک عمل رقابتی احتمال مستقر شدن باکتری‌های بیماری‌زا بر روی روده را کاهش می‌دهد. این افزایش مقاومت در مقابل بیماری‌ها به‌خصوص عفونت‌های باکتریایی، با افزودن اغلب سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس از قبیل سویه JCM 1136 نیز گزارش شده است (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۴). از آن‌جاکه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن جاندار زنده هیچ تاثیر مستقیمی بر کلونی باکتری‌های بیماری‌زا از قبیل اشرشیاکولی سلول‌های روده‌ای انسان نداشت (Hirano و همکاران، ۲۰۰۳)، احتمالاً پروبیوتیک مذکور به شکل غیرمستقیم و با بالا بردن توان دفاعی بدن ماهی از بروز سایر عفونت‌ها جلوگیری می‌کند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری پایانی با استناد بر یافته‌های تحقیق حاضر، افزودن ۲ تا ۳ گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به هر کیلوگرم غذای ماهی تیلاپیای نیل جهت بهبود عملکردهای رشد، فعالیت‌های هضمی و مقاومت در برابر عفونت باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا به پرورش‌دهندگان توصیه می‌گردد.

در پایان پیشنهاد می‌گردد جهت آگاهی از اثر متقابل استفاده هم‌زمان از پربیوتیک و پروبیوتیک و تشکیل سینبیوتیک در

www.SID.ir

Archive of SID

غذای ماهی تیلاپیای نیل بر روی عملکردهای رشد و مقاومت این ماهی در برابر عفونت‌های باکتریایی گوناگون از قبیل آئروموناس هیدروفیلا تحقیقات بیش‌تری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله علمی-پژوهشی وظیفه خود می‌دانند که از تمامی مسئولین واساتید گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران صمیمانه مراتب تقدیر و تشکر ویژه خود را به‌عمل آورند.

منابع

۱. **آهنگرزاده، م.؛ قربانپورنجف‌آبادی، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف روحانی، م. و سلطانی، م.، ۱۳۹۴**. نقش آئروموناس هیدروفیلا در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۵ تا ۱۱.

۲. **ایمان‌پور، م.ر.؛ روحی، ز.؛ سلاقی، ز.؛ بیک‌زاده، آ. و داوودی پور، ع.، ۱۳۹۴**. اثر پروبیوتیک پریمالاک بر شاخص‌های رشد، پارامترهای بیوشیمیایی خون، بازماندگی و مقاومت در برابر تنش شوری بچه ماهی کپور معمولی دریایی (*Cyprinus carpio*). مجله علوم و فنون شیلات. دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۱۷ تا ۲۸.

۳. **محمدی، ح.؛ آق، ن.؛ توکمه‌چی، ا. و نوری، ف.، ۱۳۹۰**. بررسی اثرهای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*)وسیاه‌دانه (*Nigella sativa*) بر شاخص‌های‌رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) . مجله زیست شناسی کاربردی. دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات ۲۰ تا ۲۶.

۴. **Abdel-Tawwab, M.; Abdel-Rahman, A.M. and Ismael, N.E., 2008**. Evaluation of commercial live bakers' yeast, Saccharomyces cerevisiae as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. Vol. 280, pp: 185-189.

۵. **Ardó, L.; Yin, G.; Xu, P.; Váradi, L.; Szigeti, G.; Jeney, Z. and Jeney, G., 2008**. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. Vol. 275, pp: 26-33.

۶. **Balcázar, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D. and Múzquiz, J.L., 2006.** The role of probiotics in aquaculture. Veterinary microbiology. Vol. 114, pp: 173-186.

۷. **El-Rhman, A.M.A.; Khattab, Y.A. and Shalaby, A.M., 2009**. Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 27, pp: 175-180.

۸. **FAO. 2016**. Food and Agriculture Organization Publications, Rome.

۹. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1996**. Aquaculture production statistics 1985–94. FAO Fisheries Circular, no. 815, Revision 8. FAO, Rome.

۱۰. **Furne, M.; Hidalgo, M.C.; Lopez, A.; Garcia-Gallego, M.; Morales, A.E.; Domezain, A.; Domezaine, J. and Sanz, A., 2005**. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A comparative study. Aquaculture. Vol. 250, pp: 391-398.

۱۱. **Giannenas, I.; Karamaligas, I.; Margaroni, M.; Pappas, I.; Mayer, E.; Encarnação, P. and Karagouni, E., 2015.** Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish physiology and biochemistry. Vol. 41, pp: 119-128.

۱۲. **Hirano, J.; Yoshida, T.; Sugiyama, T.; Koide, N.; Mori, I. and Yokochi, T., 2003**. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic Escherichia coli infection of human intestinal cells in vitro. Microbiology and immunology. Vol. 47, pp: 405-409.

۱۳. **Hummel, B.C.W., 1959**. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. Canadian journal of biochemistry and physiology. Vol. 37, pp: 1393-1399.

۱۴. **Lara-Flores, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Guzmán-Méndez, B.E. and 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. Vol. 216, pp: 193-201.

۱۵. **Nayak, S.K., 2010**. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & shellfish immunology. Vol. 29, pp: 2-14.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۶. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003**. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol. Vol. 15, pp: 443-452.

۱۷. **Panigrahi, A.; Kiron, V.; Kobayashi, T.; Puangkaew, J.; Satoh, S. and Sugita, H., 2004.** Immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Vet. Immunol. Immunopathol. Vol. 102, pp: 379–388.

۱۸. **Pirarat, N.; Kobayashi, T.; Katagiri, T.; Maita, M. and Endo, M., 2006**. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 113, pp: 339-347.

۱۹. **Refstie, S.; Landsverk, T.; Bakke-McKellep, A.M.; Ringø, E.; Sundby, A.; Shearer, K.D. and Krogdahl, Å., 2006**. Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. Aquaculture. Vol. 261, pp: 269-284.

۲۰. **Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, Ş.; Firat, K.; Otgucuoğlu, Ö. and Küçüksari, H., 2008**. Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. Vol. 280, p p: 140-145.

۲۱. **Wang, M. and Lu, M., 2016**. Tilapia polyculture: a global review. Aquaculture Research. Vol. 47, pp: 2363-2374.

۲۲. **Yanbo, W. and Zirong, X., 2006**. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal feed science and technology. Vol. 127, pp: 283-292.

۲۳. **Ziaei-Nejad, S.; Rezaei, M.H.; Takami, G.A.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A.R. and 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. Vol. 252, pp: 516-524.

www.SID.ir