اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*)

نسیم‌سادات حسینی‌مدنی[1*]، نرگس مورکی[2]، سید امیرعلی انوار[3]، حامد منوچهری[4]، مهوش قربانی[5]

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر کاربرد گونهٔ باکتریایی *Pediococcus acidilactici* (CNCM-MA18/5M, Lallemand, France) از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور(*Andinocara rivulatus*) انجام شد. در این تحقیق ۱۲۰ عدد ماهی به ترتیب با میانگین وزن و طول اولیه ۰/۲۰± ۳/۹۳ گرم و ۰/۲۰± ۴/۸۳ سانتیمتر تهیه و به طور تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم رهاسازی شدند. پس از ۱۴ روز از دورهٔ تطبیق، آکواریوم ها به چهار گروه هر کدام با سه تکرار تقسیم و ماهیان با چهار جیره آزمایشی ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس حاوی سطوح CFU/kg 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} و ۰ پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به مدت ۸۴ روز تغذیه گردیدند. در طول دوره ماهیان هر ۲۱ روز یکبار زیست‌سنجی شدند و شاخصهای رشد محاسبه گردیدند. پس از پایان دوره پرورش خون‌گیری از ماهیان انجام شد. نتایج نشان دادند که به طور کلی شاخصهای رشد تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است($P<0/05$) و ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی CFU/kg 10^{8} پروبیوتیک به طور معنی‌داری رشد بهتری نسبت به تیمارهای دیگر و شاهد داشتند. پارامترهای خونی شامل گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV ، MCH و گلبول سفید در گروه تغذیه شده با جیره حاوی CFU/kg 10^{8} پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد($P<0/05$). در مجموع این تحقیق پیشنهاد می‌کند ماهیان گرین ترور تغذیه شده با جیره حاوی CFU/kg 10^{8} پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* از بازده رشد، میزان بقاء و پارامترهای خونی مناسبی برخوردارند.

واژگان کلیدی: *پروبیوتیک Pediococcus acidilactici، شاخص‌های رشد، پارامترهای خونی، ماهی زینتی گرین ترور (Andinocara rivulatus)*

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۲

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی امروزه تبدیل به تجارتی منحصر به فرد در مقایسه با سایر عرصه‌های تجاری در صنعت آبزی‌پروری شده است و از این جهت انجام پروژه‌های تحقیقاتی در این زمینه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بخشی از پروژه های تحقیقاتی که در این خصوص به اجرا در می‌آید، بر بهبود بازده رشد و کارائی جیره مصرفی تاکید دارد(۱۱). برای ارتقاء شاخص‌های رشد در یک بازه زمانی معین، میزان بقاء و کارائی جیره مصرفی، کاربرد محرک‌های رشد و مکمل‌های غذایی می‌تواند سودمند باشد؛ گروه وسیعی از این مکمل ها پروبیوتیک‌ها «سویه میکروبی زنده که دارای تأثیرات سودمند بر روی میزبان از طریق تأثیر بر فلور میکروبی لوله گوارش و بهبود مصرف غذا، ارتقاء و واکنش میزبان در برابر بیماری‌ها و یا از طریق بهبود شرایط محیطی میزبان می‌باشد» هستند(۱۸).

گروه موثری از پروبیوتیک‌ها باکتری‌های اسید لاکتیک (Lactic acid bacteria) شامل: *Lactobacillus spp.*، *Carnobacterium spp.*، *Lactococcus* *Enterococcus faecium* می‌باشند، که تحقیقات وسیعی بر روی اثر کاربرد آنان در جیره شده است(۹)، طیفی از انواع باکتریوسین‌ها توسط سویه‌های *Pediococcus acidilactici* ترشح می‌شود(۶ و۳). این باکتریوسین‌ها سبب مقاومت گونه‌های آبزیان در برابر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زا می‌شوند(۱۰). کاربرد این گونه به عنوان مکمل پروبیوتیکی بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان (۱۴و۱۳) گربه ماهی کانالی (۱۷)، تیلاپیای نیل (۲۱) و میگوی *Litopenaeus stylirostris*(۸ و۷) مورد ارزیابی قرار گرفته است، اما در خصوص ماهیان زینتی تاکنون پژوهشی

۱*ـ دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران nasim_madani66@yahoo.com

۲ـ استادیار دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه بهداشت مواد غذایی، تهران، ایران.

۴ـ استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، بابل، ایران.

۵ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

انجام نشده است. پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین‌ها از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی نظیر آمیلاز و پروتئاز و تولید مواد مغذی ضروری (ویتامین‌ها، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه) سبب افزایش میزان هضم و جذب مواد غذایی شده که این خود سبب بهبود شاخص‌های رشد، و بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌گردد(۱۱). بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک آبزیان را در نتیجه بهبود و ارتقاء فرمولاسیون جیره، علاوه بر شاخص‌های رشد می‌توان با فاکتورهای خونی نیز ردیابی نمود (۱٦). مطالعات مختلفی در مورد تاثیر پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی ماهیان صورت گرفته است، که از آن جمله می‌توان به بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپیای نیل(۱۰) و مطالعه اثر بخشی پروبیوتیک باکتوسل در مقابله و مواجهه با باکتری عامل بیماری استرپتوکوکوزیس (۱)، اثر پروبیوتیک *Basillus subtilus* بر شاخص‌های خونی کپور هندی(۱۷) و پروبیوتیک پروتکسین بر شاخص‌های خونی ماهی اسکار (۱۱) اشاره نمود. با توجه به این حقیقت که منابع و اطلاعات کاربردی در رابطه با پارامترهای هماتولوژی به طور کلی در رابطه با ماهیان و به خصوص ماهیان زینتی کم می‌باشند، این بخش نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد(۱۱). گونهٔ زیستی *Andinocara rivulatus* متعلق به خانواده Cichlidae ماهی زینتی پرطرفدار آکواریومی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کاربرد گونه باکتریایی *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، شاخص‌های تغذیه‌ای و فاکتورهای خونی ماهی زینتی گرین ترور و تعیین دز موثر آن می باشد.

مواد و روش کار

طراحی آزمایش

تعداد ۱۲۰ عدد ماهی گرین ترور به ترتیب با میانگین وزن و طول اولیه ۰/۲۰± ۳/۹۳ گرم و۰/۲۰± ٤/۷۳ سانتیمتر همگی از یک والد تهیه و در قالب ٤ تیمار هرکدام با سه تکرار در ۱۲ عدد آکواریوم (هرکدام دارای ۱۰ عدد ماهی) با ابعاد ٤۰×۳۰×۵۰ به طور کاملاً تصادفی رهاسازی شدند. پس از گذشت ١٤ روز به منظور تطابق تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی تهیه شده آغاز گردید. آب مورد استفاده برای پرورش ماهیان در طول دوره از نقطه نظر فاکتورهای دما، اکسیژن محلول، PH، نیتریت و سختی مورد پایش قرار گرفت و فاکتورهای فوق در قالب مقادیر میانگین در جدول(۱) ارائه شده است. برای حفظ کیفیت آب در طی دوره از فیلتر شنی استفاده شد و ٤۰ درصد حجم کل آب هر سه روز یکبار و در بعضی موارد هر دو روز یکبار تعویض گردید.

جدول ۱ـ دامنه تغییرات پارامترهای آب آکواریوم‌ها در طول دوره پرورش

فاکتور	pH	دما	اکسیژن محلول	نیتریت	سختی کل
مقدار	٦/٥–۷/٥	۲۷±۱^{oC}	٦/٥–۸ppm	۰/۰۲ mg l^{-1}	۱۷۰±۰/٥ mg l^{-1}

ساخت جیره آزمایش

جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان با استفاده از نرم افزار Win Feed 2.8 و با استفاده از مواد اولیه به شرح جدول(۲) تهیه گردید؛ سپس پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (CNCM- MA 18/5 M, Lallemand, France) در سه سطح مختلف شامل: تیمار یک: ماهیان تغذیه شده با 10^{9}CFU/kg (T_1)، تیمار دو: ماهیان تغذیه شده با 10^{8}CFU/kg (T_2)، تیمار سه: ماهیان تغذیه شده با 10^{7}CFU/kg (T_3)، به عنوان مکمل به جیره پایه ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس اضافه گردید. گروه شاهد نیز ماهیان تغذیه شده با جیره پایه

Archive of SID

www.SID.ir

فاقد پروبیوتیک بودند. برای ساخت جیره پایه مواد اولیه آسیاب شده با یکدیگر به صورت همگن مخلوط شده و سپس مقداری از روغن و مقداری آب برای تهیه خمیر به مواد اضافه شد، خمیر تهیه شده به رشته‌های اکسترود تبدیل و در آون با دمای ٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ٨ ساعت خشک شد و در نهایت به پلت‌هایی به قطر ١/٥ میلیمتر کوچک و در داخل کیسه‌های پلاستیک در یخچال نگهداری شدند. هر روز قبل از غذادهی به ماهیان پروبیوتیک مورد نظر در بخشی از روغن جیره حل شده و به طور یکنواخت بر روی وعده غذایی پاشیده می‌شد. ماهیان متناسب با میزان اشتها روزانه حدود ٢/٥ درصد بیوماس دو مرتبه در روز (٩ صبح و ٦ بعد از ظهر) تغذیه شدند.

جیره‌های غذایی مورد نظر پس از آماده سازی برای حصول اطمینان از کیفیت و ترکیب تقریبی به آزمایشگاه منتقل شدند و میزان پروتئین با استفاده از روش کجلدال و چربی خام مطابق با روش سوکسله توسط دستورالعمل(1990)AOAC اندازه‌گیری گردید(٥). رطوبت، فیبر، خاکستر، کربوهیدرات نیز به روش استاندارد (1990)AOAC اندازه‌گیری شد(٥).

جدول ٢ـ اجزای غذایی و آنالیز شیمیایی تقریبی جیره‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک بر حسب درصد.

تیمار / مواد غذایی	T_1	T_2	T_3	C
آردماهی	٢٦/٤٥	٢٦/٤٥	٢٦/٤٥	٢٦/٤٥
آردمخمر	٢٢/٥٦	٢٢/٥٦	٢٢/٥٦	٢٢/٥٦
گلوتن گندم	١٧/٠٤	١٧/ ٠٤	١٧/٠٤	١٧/٠٤
روغن سویا	١	١	١	١
آرد گندم	٣	٣	٣	٣
لسیتین	٢	٢	٢	٢
دی کلسیم فسفات	١٢/٩٥	١٢/٩٥	١٢/٩٥	١٢/٩٥
افزودنی*	١٥	١٥	١٥	١٥
پروبیوتیک(g/kg)	١	٠/١	٠/٠١	–
آنالیز شیمیایی:				
ماده خشک(درصد)	٩٤/٠٨	٩٤/٠٨	٩٤/٠٨	٩٤/٠٨
پروتئین خام	٤٠/٣٢	٤٠/٣٢	٤٠/٣٢	٤٠/٣٢
چربی خام	٥/٩٦	٥/٩٦	٥/٩٦	٥/٩٦
فیبر	١/٦٠	١/٦٠	١/٦٠	١/٦٠
خاکستر	٤/٥٦	٤/٥٦	٤/٥٦	٤/٥٦
کربوهیدرات	٧/٤٠	٧/٤٠	٧/٤٠	٧/٤٠
انرژی	٢٤٤/٥٢	٢٤٤/٥٢	٢٤٤/٥٢	٢٤٤/٥٢

***مواد افزودنی شامل:** آستاگزانتین ٠/٠٤٩درصد- فلفل قرمز ٢درصد- آنتی اکسیدان ٠/٠٧٦ درصد- هم بند ١ درصد- مخلوط مواد معدنی ١/٥ درصد- مخلوط مواد ویتامینی ٢ درصد- ال- کارنیتین١/١٧٦ درصد- ضد قارچ ٠/٣٣درصد- متیونین ١ درصد- لیزین ١ درصد- سبوس گندم٠/٥٣درصد- پودرسیر٢/٣ درصد- کولین کلراید ٢ درصد.

Archive of SID

www.SID.ir

ماهیان هر ۲۱ روز یکبار با توجه به رشد آنها و به منظور جلوگیری از وارد آمدن استرس برای اندازه گیری طول کل و وزن کل مورد بررسی قرار می‌گرفتند. برای محاسبه بازده رشد، تغذیه و میزان بقاء از فرمول‌های زیر استفاده گردید (۱۵و۱۰):

پارامترهای رشد	فرمول
افزایش وزن بدن (WG)	WG = وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم)
درصد افزایش وزن بدن(WG%)	WG (٪) = [وزن اولیه (گرم) ÷ وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم)] ×۱۰۰
ضریب رشد ویژه وزنی(SGR_w)	SGR_w = [تعداد روزهای غذا دهی/ لگاریتم وزن اولیه (گرم) – لگاریتم وزن نهایی (گرم)] ×۱۰۰ (%day^{-})
ضریب تبدیل غذایی(FCR)	FCR= غذای مصرفی (گرم) / وزن بدن (گرم)
ضریب چاقی(CF)	CF=[طول نهایی ماهیان در انتهای پرورش(سانتیمتر) ÷ وزن نهایی ماهیان در انتهای پرورش (گرم)] ×۱۰۰
درصد بقاء (SR)	SR (%) = (تعداد ماهیان در وزن اولیه ÷ تعداد ماهیان در وزن نهایی) ×۱۰۰

بررسی فاکتورهای خونی

در پایان دوره ۸٤ روزه پرورش، پس از گذشت ۲٤ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۳ تا ٦ عدد از ماهیان هر تیمار پروبیوتیکی به طور تصادفی انتخاب و در اژنول (از مشتقات گل میخک) به میزان نیم میلی لیتر در یک لیتر آب بیهوش شدند(۱). سپس ماهیان را خشک کرده و با استفاده از اسکالپل، ساقه دمی آنها قطع گردید. ۲سی‌سی خون به وسیله لوله موئینه هپارینه درون ویال‌های آغشته به ۲۵ میکرولیتر هپارین ریخته شد. برای شمارش گلبول قرمز و سفید با استفاده از سمپلر و محلول رقیق کننده نات هریک خون را رقیق نموده و با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار اقدام به شمارش گلبول قرمز و سفید گردید(۱۱) برای اندازه گیری هموگلوبین از روش سیان مت هموگلوبین استفاده شد و میزان هماتوکریت از روش میکرو هماتوکریت محاسبه گردید(۱). برای اندازه گیری شاخصهای MCV، MCH، MCHC از فرمول های زیر استفاده شد (۱۱):

MCV (μm^3) =[HCT÷ RBC(million)] ×10 حجم متوسط گلبول قرمز خون

MCH (pg/cell)= [Hb ÷ RBC(million)] ×10 هموگلوبین متوسط گلبول قرمز خون

MCHC (g/dl) = (Hb ÷ Hct) ×100غلظت متوسط هموگلوبین سلول قرمز

آنالیز آماری

آنالیز آماری با ورود داده‌های حاصل از انجام بیومتری و آزمایش خون به صفحات گسترده اکسل آغازگردید. در نرم افزار اکسل، میانگین داده‌ها محاسبه گردید و سپس به نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ منتقل شد تا از نظر وجود میزان اختلاف معنادار بین تیمارها بررسی شوند. با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One-Way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون Post hoc LSD در سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تکرارها استفاده گردید.

نتایج

بازده رشد، میزان بقاء و شاخص تغذیه

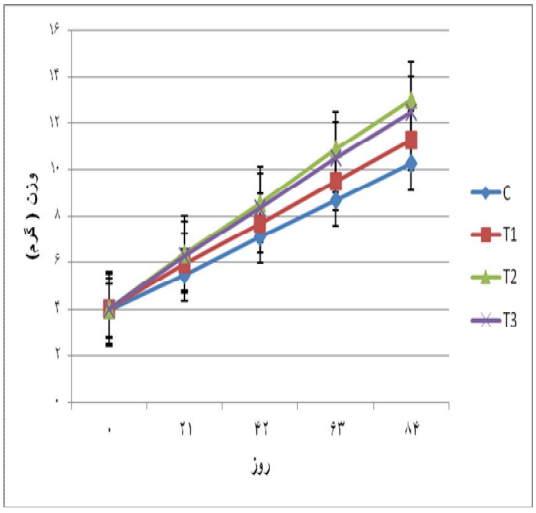
Archive of SID
www.SID.ir

در شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی به لحاظ وزن اولیه وجود نداشت($P>0/05$) (جدول ۳). اما به لحاظ وزن نهایی و میانگین افزایش وزن در چهار گروه مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید؛ به گونه‌ای که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک از وزن بیشتری در مقایسه با دو تیمار دیگر و گروه شاهد برخوردار بودند($P<0/05$)(نمودار۱). همچنین با بررسی روند افزایش طول نیز مشخص شد که با وجود عدم تفاوت در طول اولیه پس از گذشت ۸۴ روز از تغذیه ماهیان در پایان دوره، اختلاف معنی‌داری در میزان طول کل ماهیان گروههای شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک مشاهده شد($P<0/05$)(نمودار۲).

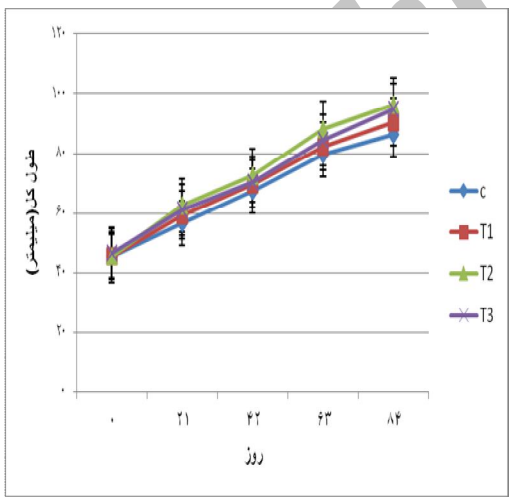
جدول ۳- مقایسه شاخص‌های رشد، تغذیه و درصد بقاء(میانگین± انحراف معیار) ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح متفاوت پروبیوتیک و گروه شاهد طی ۸۴ روز پرورش.

فاکتور / تیمار	T_1	T_2	T_3	C
افزایش وزن(گرم)	۷/۲۶±۰/۳۵^{c}	۹/۰۳ ±۰/۲۱^{a}	۸/۴۹±۰/۵۰^{b}	۶/۳۲±۰/۵۰^{d}
درصد افزایش وزن بدن	۱۸۰/۰۵±۱۶/۸۳^{c}	۲۲۵/۷۵±۲۲/۳^{a}	۲۱۱/۷۲±۱۵/۳۱^{b}	۱۶۰/۸۱±۲۰/۲۴^{d}
افزایش طول(سانتیمتر)	۴/۵۱±۰/۷۳^{c}	۵/۰۵±۰/۵۳^{a}	۴/۸۲±۰/۶۴^{b}	۴/۰۶±۰/۷۶^{d}
ضریب رشد ویژه وزنی	۱/۲۳±۰/۱۱^{c}	۱/۴۱±۰/۱۷^{a}	۱/۳۳±۰/۱۲^{b}	۱/۱۴±۰/۱۰^{d}
فاکتور وضعیت	۱/۵۰±۰/۰۹^{b}	۱/۴۶±۰/۱۱^{b}	۱/۴۸±۰/۱۳^{b}	۱/۶۱±۰/۰۸^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۴۴±۰/۳۴^{a}	۱/۹۸±۰/۳۴^{b}	۲/۰۱±۰/۴۲^{b}	۲/۴۶±۰/۳۴^{a}
درصد بقاء	۷۳/۳^{b}	۹۳/۳^{a}	۹۳/۳^{a}	۹۰^{a}

*وجود حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد($P<0/05$).



نمودار۱- روند تغییرات وزن ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی۸۴ روز پرورش.



نمودار۲- روند تغییرات طول کل ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی ۸۴ روز پرورش.

Archive of SID

www.SID.ir

فاکتورهای خونی

فاکتورهای خونی محاسبه شده برای ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک در این تحقیق در جدول(٤) ارائه شده است. افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول های قرمز ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک مشاهده شد($P<0/05$) و تعداد گلبول‌ها در این تیمار بیشتر از سایر گروه‌های مورد بررسی می‌باشد؛ پس از آن ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 CFU/kg پروبیوتیک بیشترین تعداد گلبول های قرمز را در نمونه خون خود داشتند که این دو گروه دارای اختلاف معنی‌داری($P<0/05$) در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/Kg پروبیوتیک و شاهد بودند.

مقدار هموگلوبین به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg و 10^7 پروبیوتیک به طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش می یابد و پس از آن در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/Kg پروبیوتیک و شاهد به طور معنی‌داری($P<0/05$) کاهش می یابد. بیشترین میزان هماتوکریت در T_2 مشاهده شد که با اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مورد بررسی و گروه شاهد کاهش می‌یابد ($P<0/05$). بیشترین میزان MCH در نمونه خون ماهیان شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود($P<0/05$)؛ این شاخص به طور معنی‌داری در T_1 کاهش می‌یابد. بیشترین میزان MCV در ماهیان گروه شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود($P<0/05$) و کمترین میزان آن در ماهیان T_2 مشاهده شد. بیشترین مقدار شاخص MCHC در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک دیده شد و به طور معنی‌داری این شاخص در نمونه خون ماهیان T_1 کاهش یافت($P<0/05$). بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8CFU/Kg پروبیوتیک شمارش شد که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها می‌باشد ($P<0/05$).

جدول ٤- مقایسه پارامترهای خون شناسی (میانگین ± انحراف معیار) ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و شاهد طی٨٤ روز پرورش

تیمار / فاکتور	T_1	T_2	T_3	C
گلبول قرمز (تعداد در میلی متر مکعب × 10^6)	١/٥٧±٠/٠٦^c	٢/١٠±٠/٠٩^a	١/٨٢±٠/٠٦^b	١/٥٤±٠/٠٦^c
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	٤/٣٦±٠/٠٩^c	٦/٨٠±٠/٠٥^a	٦/١٠±٠/٠٩^a	٥/٦٤±٠/٩١^b
هماتوکریت(درصد)	١٦/٢٠±١/٨٢^c	٢٠±٠/٩٧^a	١٨/٠٢±١/٢^b	١٧±١/٤١^c
MCH(پیکوگرم)	٢٧/٧٧±٠/٠٨^c	٣٢/٣٨±١/١٣^b	٣٣/٥٢±٠/٠٩^b	٣٦/٦٢±٠/٩١^a
MCHC (گرم در دسی لیتر)	٢٦/٩١±٠/٩١^b	٣٤/٠±٠/٩١^a	٣٣/٨٥±٠/٩١^a	٣٣/١٨±٠/٥٨^a
MCV(فمتولیتر)	١٠٣/١٨±٠/١٩^b	٩٥/٢٤±١/٠١^d	٩٩/٠١±١/٢١^c	١١٠/٣٩±٠/٩١^a
گلبول سفید (تعداد در میلیمتر مکعب × 10^3)	١٤/٥٠±٠/٢٥^c	٢٧/١٠±٠/٩٢^a	١٧/٨٦±٠/٥٣^b	١٦/٧١±٠/٤٦^b

*وجود حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد($P<0/05$).

بحث

شاخص‌های رشد، بقاء و تغذیه

مطالعات متعددی در سال‌های اخیر نقش مفید پروبیوتیک‌ها در تغذیه و همچنین تاثیر حفاظتی آنها در برابر عوامل پاتوژن را مشخص نموده‌اند(٢٠). اثر سویه *Pediococcus acidilactici* برای طیفی از انواع آبزیان شامل ماهی قزل آلای رنگین کمان(١٥و١٣،١٤) گربه ماهی کانالی(١٧) و میگوی *Litopenaeus stylirostris* (٨ و٧) مورد ارزیابی قرار گرفته

Archive of SID

www.SID.ir

است، اما در خصوص ماهیان زینتی گزارشی در دست نیست(۱۱). همچنین مشخص شده است که این گونه باکتریایی سبب افزایش رشد لارو ماهی توربوت (*Psetta maxima*) نیز می گردد(۱۹). در تحقیق حاضر افزودن پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به عنوان گونه ای از باکتری های اسید لاکتیک به جیره غذایی ماهی گرین ترور منجر به افزایش رشد آنها در مقایسه با گروه شاهد گردید که این تفاوت معنی‌دار بود.

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی که بر روی ماهی تیلاپیای نر *Oreochromis niloticus* با میانگین وزنی ۱۷۵ گرم به مدت ۳۲ روز انجام دادند، عملکرد رشد بهتری را در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند، هر چند این تفاوت معنی‌دار نبود(۱۰)، اما مطالعات دیگری در ارزیابی اثر پروبیوتیک*P. acidilactici* برعملکرد رشد و استفاده از مواد مغذی نتایج متناقضی را گزارش کردند(۲۱ و ۱۷). Anderson در سال ۲۰۱۳ در بررسی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر فلور میکروبی ماهی قزل آلا با میانگین وزنی۳۱۰ گرم به مدت ٤ هفته تفاوت معنی‌داری را در رشد این ماهی مشاهده کرد(٤).

Firouzbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز افزایش رشد معنی‌داری را بر روی پارامتر های رشد ماهی زینتی اسکار تغذیه شده با پروبیوتیک پروتکسین مشاهده کردند(۱۱)، همچنین در تحقیقی که توسط Zhou و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت افزایش رشد معنی‌داری در ماهی تیلاپیای نیل زمانی که پروبیوتیک به آب محیط پروش اضافه می‌شود گزارش گردید(۲۱). تفاوت در این نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه میزبان و گونه پروبیوتیک و طریقه در اختیار قرار گرفتن پروبیوتیک توسط پرورش دهنده باشد(۱۲). با این حال افزایش رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^{8} CFU/Kg پروبیوتیک در تحقیق حاضر نسبت به سایر تیمارها مشهودتر بود، علت این امر می‌تواند به دلیل تاثیر پروبیوتیک در بهبود فلورطبیعی روده باشد که با ترش آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز، لیپاز و پروتئاز باعث تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی و بهبود تغذیه میزبان می‌شوند(۱۱). در نتیجه با افزایش قابلیت هضم و افزایش جذب غذای بلعیده شده، کارایی تغذیه را افزایش داده که منجر به افزایش رشد ماهیان می‌گردد(۱۱و۹). بنابراین، افزایش قابلیت هضم همراه با ویژگی های آنتی باکتریایی پروبیوتیک ها باعث افزایش وزن و بقای ماهیان می‌گردد(۱۱). همچنین علت کاهش رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^{9} CFU/kg پروبیوتیک در تحقیق حاضر می‌تواند به این دلیل باشد که استفاده بیش از حد از پروبیوتیکها منجر به تداخل در متابولیسم طبیعی بدن و در نتیجه کاهش رشد در ماهیان این گروه نسبت به سایر تیمارها باشد که البته این مورد نیازمند بررسی بیشتر می‌باشد.

در مطالعه حاضر میزان FCR در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^{8} CFU/kg پروبیوتیک نسبت به تیمارهای T_1 و گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. میزان SGR نیز در ماهیان تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. نتایج مشابهی در استفاده از پروبیوتیک در افزایش نرخ رشد ویژه وزنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد به دست آمده است، از جمله کاهش معنی‌داری را در ضریب تبدیل غذایی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با *Bacillus sp.* مشاهده کردند(۲۰). Castex و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی رژیم غذایی میگوی بالغ *Litopenaeus stylirostris* که با جیره حاوی 10^{6} CFU/g و 10^{7} پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* تغذیه شده بود، مشاهده کردند که ضریب تبدیل غذایی در انتهای آزمایش نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است(۸). در تحقیق انجام گرفته توسط

Archive of SID

www.SID.ir

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی ماهی تیلاپیای نیل نر تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 CFU/g پروبیوتیک CNCM MA18/5M), Bactocell (Lallemand Inc.,) *Pediococcus acidilactici* (Canada صورت گرفت عدم وجود اختلاف معنی‌داری در میزان FCR و SGR گروه شاهد با گروه تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده کردند(۱۰).، همچنین در تحقیق صورت گرفته توسط Merrifield و همکاران در سال (۲۰۱۱) که بر روی تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۹ گرم با جیره پایه حاوی *P. acidilactici* به مدت ٦ هفته صورت گرفته بود تفاوت معنی‌داری در نرخ رشد ویژه مشاهده نشد(۱۵). دلیل تفاوت‌ها در این نتایج می‌تواند به علت تفاوت در نوع گونه پرورشی، اندازه و سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آنها، فرمولاسیون جیره، رفتارهای تغذیه ای، نوع پروبیوتیک مصرفی و میزان مورد استفاده آن در جیره باشد(۱۲و۱۱،۱۰). افزایش قابل توجه عملکرد و ماندگاری یا دوام ماهیان به دلیل افزودن پروبیوتیک‌ها به غذا می‌تواند به دلیل کشتن باکتری‌های مضرر توسط باکتری‌های پروبیوتیک یا ترشح ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها که مانع از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد باشد(۱۱)؛ تحقیقات صورت گرفته توسط آذری و حقیقی در سال ۱۳۹۰ در خصوص مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقابله و مواجهه با استرپتوکوکوزیس نیز در ادامه و تکمیل همین موضوع و جهت آزمایشات فیلدی و ثبت داروئی این محصول در کشور ایران بوده است(۱). در تحقیق حاضر ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/kg پروبیوتیک کمترین میزان بقاء را دارا بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت زیاد پروبیوتیک‌ها همیشه نشان‌دهنده ماندگاری و رشد بهتر نمی‌باشد(۱۱). فاکتور وضعیت در ماهیان گرین ترور تغذیه شده به نسبت گروه شاهد کمتر و این تفاوت بین تیمارهای دو و سه با گروه شاهد معنی‌دار بود.

با وجود آنکه اغلب مطالعات مرتبط از غلظت‌های مختلف پروبیوتیک‌ها استفاده نموده‌اند، اما هنوز هم نسبت و غلظت بهینه آنها به روشنی و قابل تعمیم به سایر موارد بیان نشده است و نیاز به تحقیقات فیلدی فراوان می‌باشد(۱۱). همچنین غلظت‌های مورد نیاز پروبیوتیک‌ها به منظور ایجاد اثرات القایی مناسب و جلوگیری از بروز بیماری‌ها در گونه‌های مختلف آبزیان در شرایط مختلف مانند نوع جیره غذایی، شدت تغذیه، طول دوره پرورش، نوع پروبیوتیک و مقدار آن، نوع گونه پرورشی و فاکتورهای محیطی، استرس و غیره متفاوت بوده و سؤالات متعددی در این مورد وجود دارد(۹). به طور عمده، تعیین اینکه آیا به طور واقعی پروبیوتیک ها تأثیر مثبتی روی طعم غذا داشته و تغییری را در بهبود قابلیت هضم غذا ایجاد می‌نمایند نیز بسیار مهم می‌باشد(۲۰ و ۹)، که می‌تواند از اهداف تحقیق در آینده باشد.

پارامترهای خونی

مطالعات صورت گرفته بر روری گونه‌های مختلف ماهی موید این مطلب می‌باشد که بسیاری از پارامترهای خون شناسی در ماهی نیز همانند پستانداران تحت تاثیر مجموعه ای از عوامل محیطی و بیولوژیک مانند سن، جنس، تولید مثل، طول و وزن ماهی و عوامل بیماری‌زا دستخوش تغییر و دگرگونی می‌گردد(۱۱و۲). تأثیر تغذیه و مواد افزودنی غذایی بر روی فاکتورهای خونی در بعضی مطالعات مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۱۵و۱۱). در این مطالعه آنالیز هماتولوژی ماهیان گرین ترور تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک *P. acidilactici* نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک افزایش بیشتری در تعداد کل WBC داشتند که نسبت به تیمارهای دیگر پروبیوتیکی و شاهد معنی‌دار بود.

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش تعداد گلبول‌های سفید در ماهی تیلاپیای نیل تغذیه شده با جیره حاوی 10^{7}CFU/g از این پروبیوتیک (۱۰)، در ماهی زینتی اسکار با نام علمی (*Astronotus ocellatus*) تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک پروتکسین(۱۱) و در کپور هندی با نام علمی (*Labeo rohita*) که با مکمل پروبیوتیک *Bacillus subtilus* تغذیه شده بودند نیز مشاهده گردید(۱۶). افزایش تعداد WBC می‌تواند به عنوان یک واکنش سیستم ایمنی غیراختصاصی مطرح باشد که ناشی از مصرف پروبیوتیک‌ها است در نتیجه انتظار می‌رود که این ماهیان دارای مقاومت بیشتری در برابر عوامل استرس زا و بیماری‌ها باشند که البته این مورد نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد(۱۶ و ۱۱). در تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌داری در مقادیر حجم متوسط گلبول قرمز(MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز(MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز(MCHC) در ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح متفاوت پروبیوتیک و گروه شاهد دیده شد که مشابه با تحقیقات صورت گرفته توسط Firouzbakhsh و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ماهی اسکار تغذیه شده با مکمل پروتکسین می‌باشد(۱۱). مطالعه شاخص‌های گفته شده می‌تواند در تشخیص انواع کم‌خونی‌ها و فقر آهن مفید باشند(۲). پایین بودن مقدارMCV 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 ایجاد لخته جلوگیری می‌کند(۱۰و۱). همچنین میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین در این آزمایش در ماهیان تیمارهای T_2 و T_3 تغذیه شده با این پروبیوتیک افزایش پیدا کردند که متفاوت با تحقیقات انجام گرفته توسط Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی تیلاپیای تغذیه شده با پروبیوتیک*P. acidilactici* می‌باشد(۱۰). Fergusonو همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان می کنند که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* تفاوت معنی‌داری در سطح هموگلوبین و گلبول قرمز ایجاد نمی کند اما کاهش معنی‌داری در سطح هماتوکریت را سبب می‌شود که دلیل آن مشخص نمی‌باشد(۱۰). تمایز شدید تعداد کل RBC در ماهیان غذادهی شده با جیره حاوی 10^{8} CFU/kg پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد، سبب نرخ بالای متابولیسم ناشی از استفاده از پروبیوتیک‌ها و به دنبال آن افزایش نیاز اکسیژنی گردید. بنابراین، افزایش در تعداد RBC و افزایش تراکم هموگلوبین در نهایت منجر به افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در ماهیان غذادهی شده با جیره حاوی پروبیوتیک گردید. همچنین چنین ماهیانی قادر به تأمین بیشتر اکسیژن برای بافت‌ها در مواقعی می‌باشند که نیاز اکسیژنی بالاتر می‌رود(۱۱). در تحقیق حاضر با توجه به بارز بودن شاخص‌های گفته شده در ماهیان تغذیه شده با 10^{8} CFU/Kg می‌توان چنین برداشت کرد که این ماهیان از وضعیت جسمانی خوبی برخوردار بودند. از این مطالعه می‌توان این گونه نتیجه گرفت که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* سبب بهبود پارامترهای خون شناسی شامل افزایش تعداد گلبول قرمز، سفید، هماتوکریت و هموگلوبین می‌گردد. ضمنا در نتیجه آزمایش مشخص شد که افزودن این پروبیوتیک به میزان 10^{8} CFU/kg به جیره غذایی، اثر مناسبی در افزایش فاکتورهای وزنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارهای مورد مطالعه دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

۱- آذری تاکـــامی، ق.، حقیقـــی، ع، بهمـــنش.، ش. (۱۳۹۰): بررسی مقاومـت مـاهی قـزل‌آلای رنگـین‌کمـان تغذیـه شـده بـا مقـــادیر مختلـــف باکتوســـل در مواجهـــه بـــا بیمـــاری استرپتوکوکوزیس، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور.

۲- حقیقـی، م. (۱۳۸۸): روشـهای آزمایشـگاهی خـون شناسـی مـاهی، چـاپ اول، انتشـارات موسسـه تحقیقـات شـیلات، تهران، ایران،: ۲۳-۱۸، ۴۲-۲۹.

3- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiousis, G., Ambrosiadis, I., Koidis. P. (2008): Pediocin SA-1 an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. Jour. Bior. Tech. 99(13):5384-5390.

4- Anderson, A. (2013): The effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* on the gut micribiota ecology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykissWalbaum*). J. Plymouth. Stud. Sci. 6(1): 86-103.

5- Williams, S. (1990): Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC) 15th edn, Virginia. P: 1298.

6- Bhunia, A. K., Johnson, M.C., Ray, B., Belden, E. L. (1990): Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pedicoccus acidilactici*. Jour. App. Bact. 69(2): 211-215.

7- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J. L., Schmidely, P., Mariojouls, C. (2008): Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Jour. Aquaculture. 275(1-4): 182–193.

8- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2009): Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. J. Aqua. 294(3-4): 306-313.

9- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. (2009): Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in fin fish, Aquaculture review. J. Intern. Aquatic Res. 1: 1-29.

10- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Blacazar, J.L., S. J.L., Davies, S.J. (2010): The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jour. App. Microbio. 109(3): 851-862.

11- Firouzbakhsh, 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. J. Fish Physiol. Biochem. 37: 833-842.

12- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. (2000): The use selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. J. Aqua. 191(1-3): 259-270.

13- Merrifield, D.L., Guroy, D., Guroy, B., Emery, M.J., Liewellyn, C.A., Skill, S., Davies, S.J. (2010a): Assessment of Chlorogloepsis as a novel microbial dietary supplement for red tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Aqua. 299(1-4):128–133.

14- Merrifield, D.L., Harper, G., Dimitroglou, A., Ringø, E. and Davies, S.J. (2010b): Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Jour. Aqua. Res. 41(8): 1268-1272 .

15- Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B. and Davies, S.J. (2011): Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). J. Aqua. Nut. 17: 73-79.

16- Nayak, S.K., Swain, P., Mukherjee, S.C. (2007): Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). J. Fish. Shelfish Immu. 23(4): 892-896.

Archive of SID

www.SID.ir

17- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Klesius, P. H. (2007): Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and dieases resistance in young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), J. App. Aqua. 19: 81-91.

18- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000): Probiotic bacteria as biological control agents in aqulture. Jour. Microb. Molec. Bio. Rev. 64(4): 655-671.

19- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. (2010): *Pediococcus acidilactic*i in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. J. Aqua. 307(1-2):83-88.

20- Yanbo,W., Zirong, X. (2006): Effect of probiotic for common carp (*Cyprinu carpio*) basead on growth performance and digestive enzymes activities. J. Ani. feed sci. Tech. 127(3-4): 283-292.

21- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W. (2010): Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. J. Fish Physiol. Bio. 36(3): 501-509.

Archive of SID

www.SID.ir