

اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه‌ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

• وحید مرشدی

دانشجوی دکترای پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه و کارشناس پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

• ناصر آق (نویسنده مسئول)

دانشیار گروه شیلات پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران

• جاسم مرضی

دانشیار پژوهشی پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور، اهواز، ایران

• فرزانه نوری

استادیار گروه شیلات پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران

• تکاور محمدیان

استادیار گروه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۴

Email: agh1960@yahoo.com



چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیبات بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) با میانگین وزنی $7/64 \pm 0/3$ گرم بود. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار در تانک‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. ماهیان با جیره‌های حاوی ۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های لاشه و روده جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که لاکتوفرین جیره فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل پروتئاز، آمیلاز و لیپاز ماهی صبیتی را تغییر نداد ($p > 0/05$). در این آزمایش رابطه همبستگی ضعیف، مثبت و غیر معنی‌داری بین لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم پروتئاز، آمیلاز و لیپاز مشاهده شد ($p > 0/05$). نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین تأثیری بر روی ترکیب بیوشیمیایی بدن شامل پروتئین، خاکستر و رطوبت و فلور باکتریایی روده ندارد ($p > 0/05$)، اما میزان چربی لاشه در ماهیان تغذیه شده با ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($p < 0/05$). به طور کلی، این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی به وسیله لاکتوفرین جیره تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. علاوه بر این، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تغذیه ماهی صبیتی با جیره حاوی ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا برای یک دوره ۶ هفته‌ای ترکیب بیوشیمیایی بدن و فلور باکتریایی روده را بهبود نمی‌بخشد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه، فلور باکتریایی روده، ماهی صبیتی

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 65-74

Effects of different levels of dietary lactoferrin on digestive enzymes, body composition and intestine bacterial flora of sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling

By: Morshedi, V., PhD student of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia and Researcher of Persian Gulf Institute, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran. Agh, N., (Corresponding Author) Associate professor of Department of Fisheries of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran. Marammazi, J., Associate professor of South Iranian Aquaculture Research Center, Ahwaz, Iran. Noori, F., Assistant professor of Department of Fisheries of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran. and Mohamadian, T., Assistant professor of Department of Aquatic Health of Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University, Iran.

Received: November 2015 Accepted: January 2016

Email: agh1960@yahoo.com

The aim of this study was to determine the effects of dietary lactoferrin (LF) on digestive enzymes activity, body composition and intestine bacterial flora of sobaity (*Sparidentex hasta*) with an average weight of 7.64 ± 0.3 g. This study was carried out in a completely randomized design with three treatments and replications in fiberglass tanks with 300 liters volume. Fish were fed with feed containing 0, 400 and 800 mg lactoferrin per kg feed for 42 days. At the end of the experiment, body composition and intestine samples were collected. The obtained results indicated that dietary lactoferrin did not change sobaity digestive enzymes activity, including protease, amylase and lipase ($P > 0.05$). In this study, weak, positive and no significant correlation were observed between dietary lactoferrin and protease activity, amylase activity, and lipase activity ($P > 0.05$). The results indicated that different levels of lactoferrin did not affect body composition including protein, ash and moisture and intestine bacterial flora ($P > 0.05$) but fat content in fish fed on 400 mg lactoferrin per kg feed was significantly higher than control group ($P < 0.05$). Overall, this study showed that digestive enzymes activity was not affected by dietary lactoferrin. Moreover, it can be concluded that feeding of sobaity on the diet supplemented with 400 and 800 mg lactoferrin per kg feed for a period of 6 weeks do not improve the body composition and intestine bacterial flora.

Keyword: Lactoferrin, digestive enzymes, body composition, intestine bacterial flora, *Sparidentex hasta*

نیاز به روش‌های جایگزین از جمله استفاده از مکمل‌های غذایی برای افزایش عملکرد رشد و تغذیه و تحریک سیستم ایمنی احساس می‌شود (۲۸). انواع گسترده‌ای از ترکیبات برای این منظور استفاده می‌شوند که از آن جمله می‌توان به لاکتوفیرین اشاره کرد.

لاکتوفیرین (Lf) یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون که دارای جایگاه‌هایی برای پیوند با آهن است (۲۲). لاکتوفیرین کارکردهای زیستی فراوانی از قبیل تنظیم جذب و انتقال آهن در روده (۳۶)، بهبود فلور طبیعی روده (۳) و فعالیت‌های ضد باکتریایی (۲۱) دارد. در واقع، لاکتوفیرین آهن آزاد محیط را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری‌ها و پاتوژن‌هایی که برای رشد و تکثیر خود به آن نیاز دارند از آن محروم می‌مانند و بدین ترتیب می‌تواند فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی روده را تحت تاثیر قرار دهد. لاکتوفیرین مقاوم به حرارت بوده همچنین تا حدودی مقاوم به تجزیه پروتئولیتیک است که نشان دهنده این امر است که می‌تواند بر شرایط تولید غذا، مایعات اسیدی معده و پروتئولیتیک روده فائق آید. با توجه به این خصوصیات، تجویز خوراکی آن را که امکان تیمار توده‌ای ماهیان را داده و

مقدمه

در حال حاضر با توجه به روند روزافزون جمعیت جهان و همچنین خشکسالی و بحران آب شیرین، تقاضا برای پرورش آبزیان دریایی و غذاهای دریایی افزایش یافته و به نظر می‌رسد یکی از مشکلات اساسی انسان، دستیابی به منابع پروتئینی متنوع و سالم باشد که آبی پروری به عنوان یک راهکار اساسی، می‌تواند سهم زیادی از این تقاضا را تامین کند. علاوه بر این، تکثیر و پرورش آبزیان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود به طوری که کل تولید آبی پروری در جهان در سال ۲۰۱۳ در حدود ۹۷/۲ میلیون تن بوده است که سهم آبزیان دریایی پرورشی ۵۲/۴ میلیون تن و سهم ماهیان دریایی پرورشی حدود ۵/۷ میلیون تن است (۱۳). یکی از راهکارهای بسیار مناسب جهت دستیابی به منابع غذایی با ارزش بالا، رونق دادن به صنعت آبی پروری می‌باشد، ولی در کنار پیشرفت‌های سریع صنعت آبی پروری و تولید متراکم آن، وجود بیماری در مزارع پرورشی غیرقابل انکار است. به منظور کنترل بیماری و درمان آن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و آکسیناسیون در دهه‌های اخیر به طور کامل موثر واقع نشده است. بنابراین

شامل دما (۲۷/۱±۰/۹)، اکسیژن محلول (۰/۵۵±۰/۶۳)، شوری (۰/۵±۰/۴۸) و pH (۷/۵±۰/۱۵) در طول آزمایش برای تانک‌ها یکسان بود. در پایان آزمایش ۳ قطعه بچه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و آسان‌کشی شدند. بعد از خارج کردن امعاء و احشاء، لاشه ماهیان چرخ شده و تا زمان انجام آنالیزهای مربوطه (درصد رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنالیزهای تقریبی ترکیب بیوشیمیایی جیره غذایی آزمایشی و لاشه با استفاده از روش‌های استاندارد AOAC (۵) و حداقل با سه تکرار انجام شد. میزان رطوبت بوسیله خشک کردن نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۵ °C به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید. خاکستر بوسیله سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ °C به مدت ۱۲ ساعت محاسبه گردید. میزان پروتئین خام با ضرب محتوای نیتروژن نمونه در ضریب ۶/۲۵ و به روش کج‌لدال اندازه‌گیری و میزان چربی به روش سوکسله تعیین شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در روی یخ و تحت شرایط استریل روده این ماهیان جدا و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. جهت استخراج عصاره آنزیمی، روده ماهی (گرم محتویات روده) را به نسبت ۵: ۱ با بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT ۱۳۰۰Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه هموژن شده و سپس هموژنات به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Z۳۶HK) در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و سوپرناتانت حاصله در میکروتیوب‌ها جهت آنالیز آنزیم‌های مورد نظر تقسیم شده و تا زمان سنجش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۴). مقدار پروتئین محلول عصاره‌های آنزیمی با روش Bradford (۹) سنجش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از محلول سوبسترا آزوکازین ۱/۵٪ در ۵۰ میلی مولار بافر Tris/HCl در pH = ۷/۵ صورت پذیرفت (۱۴). فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از هیدرولیز p-nitrophenylemyristate و به طریق اسپکتروفتومتری گردید (۲۰). فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش Bradford (۸) و با استفاده از سوبسترای نشاسته سنجش گردید. نشاسته تحت تأثیر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد.

برای بررسی وضعیت میکروبی روده ماهیان، در پایان دوره از هر تیمار بطور مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. برای این منظور بعد از حذف باکتری‌های سطحی بدن با الکل ۷۰ درصد، روده ماهیان جدا شده و بعد از هموژن شدن (۴). بعد از تهیه رقت‌های مورد نظر با استفاده از سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد نمک)، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک (MRS Agar) کشت داده شد. سپس پلیت‌های تهیه شده برای هر تیمار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. در نهایت باکتری‌های کشت شده براساس واحد CFU شمارش شدند (۲۶).

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version ۱۵,۱) تحت سیستم عامل Windows انجام گرفت. از آزمون Kol-mogrove-Smirnov به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون لیون برای تعیین برابری واریانس‌ها و از آزمون همبستگی پیرسون برای بررسی رابطه بین متغیرها استفاده شد. تفاوت‌های احتمالی بین تیمارها با استفاده از

با استرس‌های دستکاری کمتری همراه است، فراهم می‌آورد (۲۲). مطالعه فعالیت آنزیمی به طور کلی نقش مهمی در جذب مواد مغذی و رشد ماهیان دارد و می‌تواند بعضی از جنبه‌های فیزیولوژی تغذیه را روشن سازد و در رفع مشکلات تغذیه‌ای مفید واقع شود. در واقع آگاهی از نقش مکمل‌های غذایی بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان یک ابزار مهم و موثر در ساخت جیره‌های غذایی مناسب به کار گرفته شود. اگرچه اطلاعاتی که تاکنون در مورد ماهیان به دست آمده نشان می‌دهد که عملکرد آنزیم‌های گوارشی از لحاظ کیفی مشابه مهره‌داران دیگر می‌باشد اما فرآیند گوارش در ماهیان کمتر از پستانداران مطالعه شده است (۱۹). علاوه بر این، در مرور منابع مطالعه‌ای که تاثیر لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی را مورد بررسی قرار باشد، یافت نشد.

با توجه به اهمیت یاد شده لاکتوفرین در بهبود فلور طبیعی روده، فعالیت‌های ضدباکتریایی و افزایش تولید در صنعت آبزی‌پروری و از طرفی با توجه به کارهای صورت گرفته در سال‌های اخیر بر روی مولدسازی ماهی صیبتی و رسیدن به بیوتکنیک تکثیر و پرورش این ماهی در کشور، چنین مکمل‌های غذایی در ماهی صیبتی مورد استفاده قرار نگرفته و باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد. بنابراین تحقیق حاضر به تعیین اثرات احتمالی سطوح مختلف لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه ماهیان صیبتی می‌پردازد.

مواد و روش کار

این تحقیق با همکاری پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور و در بخش تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی انجام شد. بچه ماهیان با وزن ۰/۳ ± ۷/۶۴ گرم از تکثیر بهار مولدین پرورشی مرکز مذکور تامین و در تانک‌های فایبرگلاس ۴۰۰۰ لیتری در بخش تکثیر و پرورش این مرکز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت انجام این آزمایش ۳ تیمار مختلف غذایی با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای هر تکرار ۴۵ قطعه بچه ماهی صیبتی انتخاب و به صورت کاملاً تصادفی در بین تانک‌های فایبرگلاس با ظرفیت ۳۰۰ لیتر (آبگیری تا ۲۵۰ لیتر) محتوی آب دریای فیلتر شده و تیمار شده با اشعه فرابنفش توزیع شدند. سپس ماهیان به مدت ۶ هفته با تیمارهای غذایی به شرح زیر تغذیه شدند.

۱. غذای کنسانتره فاقد لاکتوفرین (گروه شاهد)
۲. غذای کنسانتره حاوی ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۱)
۳. غذای کنسانتره حاوی ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۲)

از جیره غذایی تجاری (شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز) با اندازه ۲ میلی متر استفاده شد (پروتئین ۴۷/۸±۰/۴۱، چربی ۱۳/۹۲±۰/۲۲، رطوبت ۱۰±۰/۱۷، خاکستر ۹/۲۳±۰/۱۲). لاکتوفرین از شرکت Biopole SA/NV بلژیک خریداری شد و پس از توزین مقدار مورد نیاز لاکتوفرین برای هر تیمار روی غذا اسپری شد. سپس غلظت ۳ درصد ژلاتین نیز برای پوشش دار کردن غذا و جلوگیری از هدر رفت افزودنی‌ها بر روی آن اسپری شد. پس از آماده سازی، غذا درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا از فساد آن جلوگیری گردد. غذادهی ماهیان روزانه در دو نوبت با فاصله زمانی مناسب (۱۶ و ۰۹) در حد ۴/۵ درصد وزن بدن انجام شد. شرایط محیطی

اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین بر پارامترهای بیوشیمیایی لاشه در جدول ۲ و نمودار ۴ آورده شده است. میزان پروتئین، رطوبت و خاکستر لاشه اختلاف معنی داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد پریوتیک نشان ندادند ($P > 0/05$). با این حال، میزان خاکستر لاشه اختلاف معنی داری را در پایان آزمایش بین تیمار ۱ و ۲ نشان داد ($P > 0/05$). میزان چربی لاشه در پایان آزمایش به صورت معنی داری در تیمار ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین بالاتر از گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان پروتئین و خاکستر لاشه در تیمار ۲ و کمترین میزان آن ها در تیمار ۲ وجود دارد. همچنین با افزایش میزان لاکتوفرین جیره در پایان آزمایش یک روند کاهشی در میزان رطوبت لاشه مشاهده شد. نتایج مربوط به فلور باکتریایی روده تیمارهای مختلف در جدول ۳ آمده است. تعداد باکترهای اسید لاکتیک و تعداد باکترهای کل اختلاف معنی داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین نشان ندادند ($P > 0/05$). بیشترین تعداد باکترهای اسید لاکتیک و باکترهای کل در گروه شاهد و کمترین تعداد آن ها در تیمار ۲ وجود دارد. همچنین با افزایش

آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون Duncan و Tukey در نظر گرفته شد. در همه آزمون های آماری سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

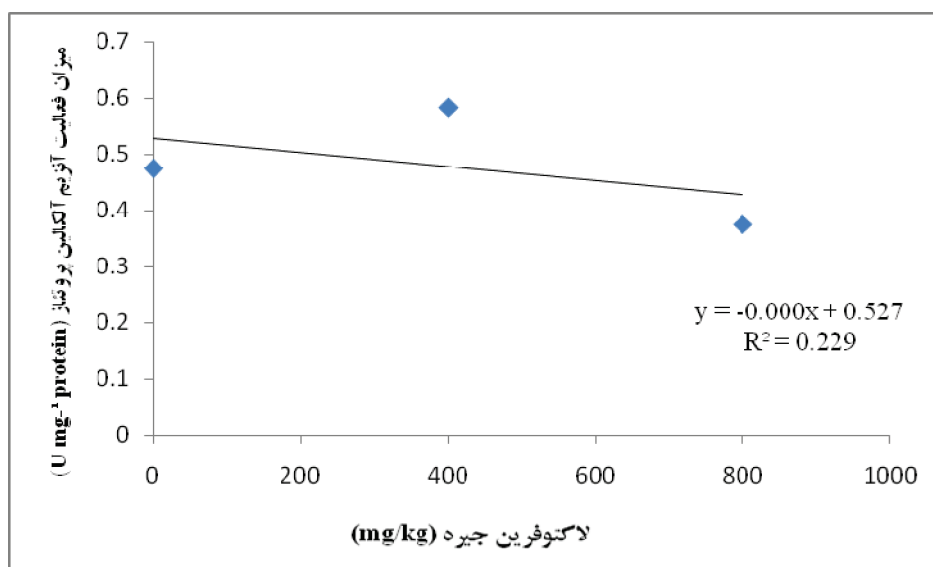
نتایج

نتایج مربوط به بررسی میزان فعالیت آنزیم های گوارشی در پایان آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در پایان آزمایش هیچ اختلاف معنی داری بین تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفرین و گروه شاهد نشان ندادند ($P > 0/05$). بیشترین میزان فعالیت پروتئاز و آمیلاز و لیپاز در تیمار ۱ گزارش شد. کمترین میزان فعالیت پروتئاز در تیمار ۲ و کمترین میزان فعالیت آمیلاز و لیپاز در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون همبستگی پیرسون در نمودار ۱ تا ۳ نشان داد که بین میزان فعالیت پروتئاز ($R^2 = 0,229$)، آمیلاز ($R^2 = 0,283$) و لیپاز ($R^2 = 0,151$) و مقدار لاکتوفرین جیره همبستگی ضعیف و مثبت وجود داشت. اما این همبستگی معنی دار نبود ($P > 0/05$).

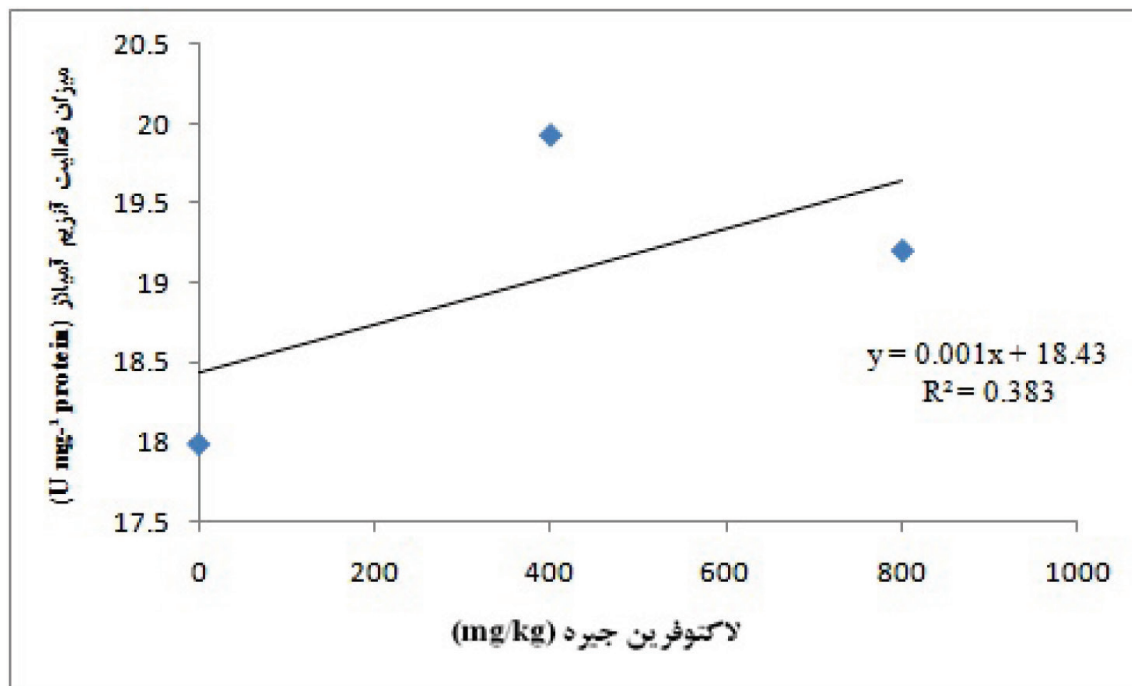
جدول ۱- فعالیت آنزیم های گوارشی بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد)

تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
۰/۳۷ \pm ۰/۰۹	۰/۵۸ \pm ۰/۱۷	۰/۴۷ \pm ۰/۰۵	پروتئاز (U mg/protein)
۱۹/۲۰ \pm ۱/۱۹	۱۹/۹۲ \pm ۱/۲۲	۱۷/۹۹ \pm ۱/۰۷	آمیلاز (U mg/protein)
۰/۰۲۲ \pm ۰/۰۰	۰/۰۲۹ \pm ۰/۰۰	۰/۰۱۷ \pm ۰/۰۰	لیپاز (μ mole/g/h)

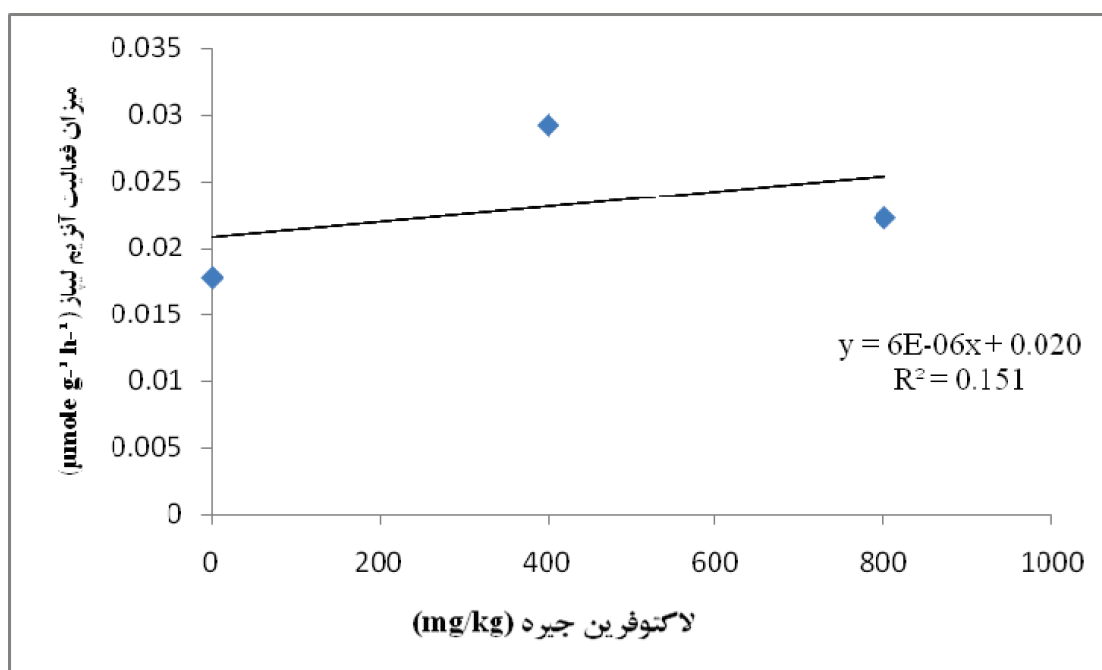
نمودار حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد



نمودار ۱- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم پروتئاز بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش



نمودار ۲- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم آلبومین بچه ماهیان صبیته در پایان آزمایش



نمودار ۳- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم لیپاز بچه ماهیان صبیته در پایان آزمایش

جدول ۲: ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد)

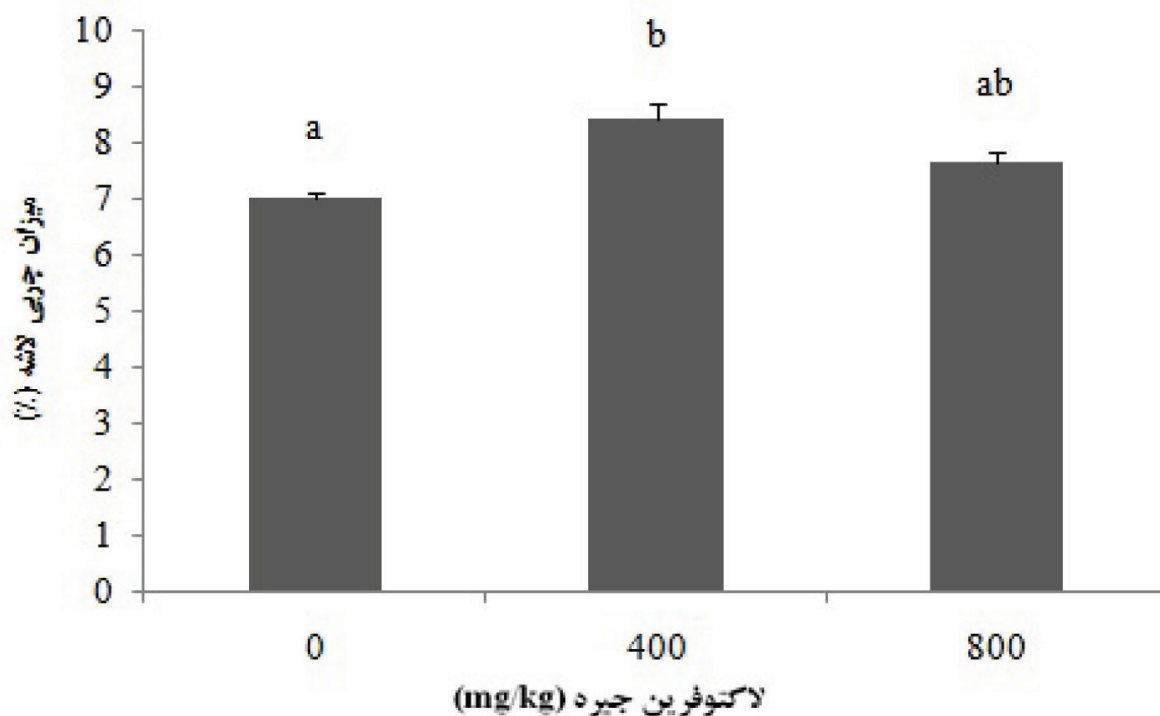
تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
۲۰/۳۴ \pm ۰/۳۲ ^a	۱۹/۷۷ \pm ۰/۰۴ ^a	۱۹/۹۹ \pm ۰/۱۷ ^a	پروتئین (%)
۱۷/۶۴ \pm ۰/۱۴ ^a	۸/۱۸ \pm ۰/۱۵ ^b	۱۳/۱۵ \pm ۱/۱۳ ^{ab}	خاکستر (%)
۶۵/۲۷ \pm ۰/۱۸ ^a	۶۶/۷۵ \pm ۰/۱۳ ^a	۶۶/۸۳ \pm ۰/۳۷ ^a	رطوبت (%)

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می باشد

جدول ۳- تعداد کلونی های باکتری (Log CFU/g) بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد)

تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
۲/۱۴ \pm ۰/۱۷	۲/۴۴ \pm ۰/۱۶	۳/۰۵ \pm ۰/۱۹	تعداد باکترهای اسید لاکتیک
۲/۳۵ \pm ۰/۱۷	۲/۲۶ \pm ۰/۲۲	۲/۹۴ \pm ۰/۲۳	تعداد باکترهای کل

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد



نمودار ۴- تغییرات میزان چربی لاشه بچه ماهیان صبیتی تیمارهای مختلف در پایان آزمایش مقادیری که با حروف متفاوت مشخص شده اند دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0/05$).

سنجش آنزیم‌های گوارشی باعث اختلال در مقادیر آنزیم‌های مورد بررسی و مقایسه گونه‌های مختلف با هم می‌شود (۱۹).

تحقیقات نشان داده است که ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان تحت تاثیر چندین عامل قرار می‌گیرند که می‌توان به عوامل ریخت‌شناسی، عوامل فیزیولوژیک و عوامل محیطی اشاره کرد (۲۹). در مورد تاثیر افزودن محرک‌های ایمنی به جیره روی کیفیت لاشه آبیان مطالعاتی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر مشاهده شد که سطوح لاکتوفرین جیره تاثیر بر روی میزان پروتئین، رطوبت و خاکستر لاشه ماهیان ندارند. با این حال، در مطالعه حاضر میزان چربی لاشه بطور معنی‌داری در تیمار تغذیه شده با ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. در همین راستا، میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه فیل ماهی و قزل‌آلا به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با ویتامین C، ویتامین E و ارگوسان اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد (۲۷، ۱۷، ۱۲). همچنین، Ahmadian (۲) تاثیر سطوح مختلف لاکتوفرین در جیره مولدین قزل‌آلای رنگین کمان بر کیفیت تخم‌های حاصله را مورد مطالعه قرار داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان چربی خام تخم‌ها بطور معنی‌داری در گروه‌های تغذیه شده با لاکتوفرین نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. میزان پروتئین خام تخم‌ها نیز در گروه تغذیه شده با ۲۰۰ میلی گرم لاکتوفرین بصورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و گروه تغذیه شده با ۱۰۰ میلی گرم لاکتوفرین افزایش پیدا کرد. همچنین El-Sayed Badawy و همکاران (۱۱) اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان چربی لاشه بین تیمارهای مختلف آزمایشی با گروه شاهد مشاهده کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. با استناد به مطالعه مذکور و تحقیق حاضر می‌توان بر این نکته تاکید کرد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره، میزان چربی لاشه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این امکان وجود دارد که لاکتوفرین با بهبودی سلامتی عمومی ماهیان و از طریق مکانیسم‌هایی که فعلا برای ما شناخته شده نیستند می‌تواند در ذخیره‌سازی بیشتر پروتئین و چربی نقش داشته باشند و بدین ترتیب در تغییر کیفیت لاشه مؤثر باشد. با توجه به دو مطالعه صورت گرفته امکان قیاس نتایج مطالعه حاضر ممکن نمی‌باشد. لذا اظهار نظر قاطع در مورد این پارامترها به تحقیقات بیشتر نیاز دارد. به علاوه، این محققین اختلاف معنی‌داری را در استفاده از سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر میزان خاکستر و رطوبت لاشه ماهی تیلاپای نیل گزارش نکردند که مشابه نتایج تحقیق حاضر بیانگر این مسئله است که سطوح لاکتوفرین جیره نتوانسته است اثرات زیادی بر روی کیفیت لاشه ماهیان بگذارد. برخی محققین بر این باورند که تغییرات در ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان مانند محتوی پروتئین و چربی می‌تواند به تغییرات در سنتز پروتئین و چربی در بدن، میزان ذخیره شان در بافت‌های بدن و نرخ رشد متفاوت نسبت داد (۱۷، ۱). فلور میکروبی ماهیان شامل مجموعه‌ای از باکتری‌ها می‌باشد که نقش مهمی را در هضم غذا و کنترل بیماری‌ها بر عهده دارند. حضور باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان باکتری‌های دائم در اکوسیستم روده ماهیان از جمله ماهی کاداقیانوسی اطلس (*Gadus morhua*)، قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) ثابت شده است اما جزء فلور غالب نیستند (۱۶). باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه تولید باکتریوسین‌ها مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند و بدین ترتیب اثرات مثبتی بر میکرو فلور روده ماهی می‌گذارند (۲۶). از آنجا که

میزان لاکتوفرین جیره در پایان آزمایش یک روند کاهشی در تعداد باکترهای اسید لاکتیک مشاهده شد.

بحث

مطالعه آنزیم‌های گوارشی یک گام ضروری به سوی پی بردن به مکانیسم گوارش ماهی می‌باشد و نقش مهمی در هضم مواد غذایی برعهده داشته و آگاهی از سطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی ماهیان موثر باشد. از طرف دیگر، تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشد (۳۳). چندین عملکرد زیستی به لاکتوفرین نسبت داده شده که نقشهای فیزیولوژیک و مکانیسم آن هنوز نامشخص است که از جمله آن می‌توان به نقش لاکتوفرین در فعالیت آنزیمی اشاره کرد (۱۰).

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از استفاده لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم پروتئاز، آلفا آمیلاز و لیپاز نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفرین و تیمار شاهد است. با توجه به این که تحقیقات صورت گرفته بر روی اثرات لاکتوفرین جیره در ماهیان فعالیت آنزیم‌های گوارشی را مورد سنجش قرار نداده‌اند، مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته بر روی سایر محرک‌های ایمنی انجام می‌گیرد. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمارهای تغذیه شده با ارگوسان اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد، اما میزان فعالیت آنزیم لیپاز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از تغذیه با ارگوسان اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نشان داد (۱۷). در مطالعه Nya و Austin (۲۵) فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده (پروتئاز کل، تریپسین و آلکالین فسفاتاز) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با محرک‌های ایمنی عصاره سیر، زنجبیل و لیپوپلی ساکارید مستخرج از دیواره باکتری به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت. این محققین بیان کردند که سیستم گوارشی ماهیان می‌تواند به وسیله عوامل خارجی از جمله تیمارهای غذایی تنظیم شود. قابل توجه است که سیستم گوارشی ماهیان توانایی پاسخ به مکمل‌های مختلف غذایی را دارد (۱۵). در مطالعه Bahram-Beigi (۷) گزارش شد که استفاده هم‌زمان و جدا از پروبیوتیک (*L. plantarum*) و پریبیوتیک زایلوالیگوساکارید اختلاف معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به وجود نیاورد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم خوانی دارد. در تضاد با مطالعه حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک و پریبیوتیک در تحقیقات مختلف گزارش شده است. در تحقیقات Xu و Wang (۲۷) و Ye و همکاران (۳۹) به ترتیب با افزودن پروبیوتیک (*Bacillus sp.*) و سطوح ترکیبی پروبیوتیک (*Bacillus clausii*) و فروکتو و مانان اولیگوساکارید به جیره ماهی کپور و کفشک ماهی ژاپنی افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) مشاهده شد. با توجه به عدم وجود همبستگی معنی‌دار بین میزان فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز و مقدار لاکتوفرین جیره، در مطالعه حاضر عدم وجود اختلاف معنی‌دار را می‌توان به کم بودن سطوح انتخابی لاکتوفرین جیره نسبت داد. البته عوامل زیادی بر نتایج متضاد به دست آمده از تحقیقات مختلف موثر می‌باشند که می‌توان به مواردی چون میزان انباشتگی روده، وضعیت تغذیه، پیچیدگی ساختار سوبسترا و ریتیم‌های فیزیولوژیکی اشاره کرد (۲۳). علاوه بر این، شرایط آزمایشی متفاوت، روش‌های مختلف جمع‌آوری نمونه و

منابع مورد استفاده

1. Abdel-Tawwab M., Abdel-Rahman M. A., Nahla-Ismael E. M. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.
2. Ahmadian E. (2012). Effects of different levels of dietary lactoferrin on egg quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. Thesis of Master of Science, Urmia University, 93 p (In Persian).
3. Al-Mashikhi ShA., Nahai Sh. (1987). Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration technique. *Journal of Dairy Science*, 70(12) : 2486-2492.
4. Andani H. R. R., Tukmechi A., Meshkini S., Sheikhzadeh N. (2012). Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 728-734.
5. AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists, 16th (end), *Procedure* 984. 25.
6. Askarian F., Matinfar A., Kousha A., Bahmani M., Khorshidi K., Shenavar A., Ringo E. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in the gastro intestinal tracts of reared Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Asipenser persicus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3(5) : 302-311.
7. Bahram Beigi M. (2013). Study of using synbiotic *Lactobacillus plantarum* probiotic and xylo oligosaccharides prebiotic on growth indices, digestive enzymes activity, immune responses and environmental shocks in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis of Master of Science, Urmia University. 107 p (In Persian).
8. Bernfeld P. (1955). Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O (Eds), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. Pp. 149-158.
9. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.
10. Brock J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 1-6.
11. El-Sayed Badawy T., Al-Kenawy D. (2013). Assessment of immune response supplemental immunon and bovine lactoferrin as alternatives to antibiotics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 8(2) : 341-355.
12. Falahatkar B., Soltani M., Abtahi B., Kalbassi M. R., Pourkazemi M. (2006). Effects of dietary vitamin C supplementation on performance, tissue chemical composition and alkaline phosphatase activ-

pH معده در ماهی بین ۳ تا ۴/۵ می‌باشد، و زمان بازماندگی غذا نسبتاً کوتاه است، این نکته عموماً پذیرفته شده است که باکتری‌هایی نظیر باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند در دستگاه گوارش زنده بمانند (۶). در مطالعه حاضر فلور باکتریایی روده (کل باکترهای روده و باکتری‌های اسید لاکتیک) تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفیرین اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد. به نظر می‌رسد که لاکتوفیرین جیره نتوانسته است فلور باکتریایی روده را تغییر دهد و به عبارتی سطوح مختلف لاکتوفیرین بر روی فلور باکتریایی تاثیر گذار نبوده است. متأسفانه، مطالعه‌ای که تاثیر لاکتوفیرین را بر فلور باکتریایی روده ماهیان بررسی کرده باشد وجود ندارد. با این حال مطالعات صورت گرفته بر روی تاثیر استفاده از لاکتوفیرین بر فلور باکتریی روده موش نشان می‌دهد که رشد باکتری‌های *Clostridium* و *Escherichia coli* Streptococcus به صورت معنی‌داری متوقف شد، اما بر رشد باکتری‌های *Bifidobacterium* موجود در روده تاثیری نداشت (۳۵). در مطالعه دیگر مشخص شده است که افزودن لاکتوفیرین به جیره باکتری‌های *Bifidobacterium* موجود در روده موش را افزایش می‌دهد (۱۸). با توجه به این که اثرات لاکتوفیرین بر فلور باکتریایی روده ماهیان مطالعه نشده است، امکان قیاس نتایج مطالعه حاضر ممکن نمی‌باشد. لذا اظهار نظر قاطع در مورد این پارامترها به تحقیقات بیشتر نیاز دارد. بطور کلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوفیرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهی صبیتی نداشت. ترکیب بیوشیمیایی بدن و فلور باکتریایی روده ماهیان نیز به صورت معنی‌داری تحت تاثیر لاکتوفیرین جیره قرار نگرفت، با این حال، نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفیرین به جیره میزان چربی لاشه را نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای مهندس نجف آبادی رئیس ایستگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی و سایر پرسنل محترم این مجموعه به جهت همکاری در مراحل عملی و آزمایشگاهی نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

- naupliar development of *Artemia* spp. from three solar saltworks in Greece. *Aquaculture*, 286: 259-265.
25. Nya E. J., Austin B. (2011). Dietary modulation of digestive enzymes by the administration of feed additives to rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquaculture Nutrition*, 17: 495-466.
26. Ringo E., Gatesoupe F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
27. Safarpour Amlashi A., Falahatkar B., Sattari M., Tolouei Gilani M. H. (2011). Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 807-814.
28. Sakai M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
29. Salam A., Davies P. M. C. (1994). Body composition of northern pike, *Esox lucius* L., in relation to body size and condition factor. *Journal of Fisheries Research*, 19: 193-204.
30. Skrodenyte-Arbaciauskiene V., Sruga A., Butkauskas D., Skrupskelis K. (2008). Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. *Fisheries Science*, 74: 1307-1314.
31. Soleimani N., Hoseinifar S. H., Merrifield D. L., Barati M., Hassan Abadi Z. (2012). Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 316-321.
32. Sun Y. Z., Yang H. L., Ma R. L., Song K., Li J. S. (2011). Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 165: 1-9.
33. Sunde J., Taranger G., Rungruangsak-Torrissen K. (2001). Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25: 335-345.
34. Suzer C., Çoban D., Kamaci H. O., Saka S., Firat K., Otgucuoglu Ö. (2008). Lactobacillus spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280, 140-145.
35. Teraguchi S., Ozawa K., Yasuda S., Shin K., Fukuwatari Y., Shimamura S. (1994). The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrin on intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58: 482-487.
36. Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M. (2006). Lactoferrin activity in beluga sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 283-286.
13. FAO. (2015). FishStat Plus datasets. Fishery statistical collections: Aquaculture Production (1950-2013; released March 2015). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
14. Garcia-Carreno F. L., Haard N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in *Langostilla pleuroncodes* planipes and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17: 97-113.
15. Garcia-Carreno F. L., Albuquerque-Cavalcanti C., del Toro M. A. N., Zaniboni-Filho E. (2002). Digestive proteinase of Brycon orbignyanus (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 132: 343-352.
16. Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y., Hoshino T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in intestinal tract of cultured fish. *Aquaculture*, 234: 335-346.
17. Heidarieh M., Mirvaghefi A. R., Akbari M., Farahmand H., Sheikhzadeh N., Shahbazfar A. A., Behgar M. (2012). Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1169-1174.
18. Hentges D. J., Marsh W. W., Petschow B. W., Thal W. R., Carter M. K. (1992). Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora-associated mice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14: 146-152.
19. Hidalgo M. C., Urea A., Sanz A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
20. Iijima N., Tanaka S., Ota Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancrease of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 59-69.
21. Jenssen H., Hancock, B. R. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91: 19-29.
22. Kumari J., Swain T., Sahoo P. K. (2003). Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94: 1-9.
23. Lopez-Vasquez K., Castro-Perez C. A., Val A. L. (2009). Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *Journal of Fish Biology*, 74: 1620-1628.
24. Moraiti-Ioannidou M., Castritsi-Catharios J., Miliou H. (2008). Biochemical composition and digestive enzyme activity during

tivities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus* Gibelio). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 351-357.

39. Ye J. D., Wang K., Li F. D., Sun Y. Z. (2011). Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 17: 902-911.

research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16: 1241-1251.

37. Wang Y. B., Xu Z. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 283-292.

38. Xu B., Wang Y., Li J., Lin Q. (2009). Effect of prebiotic xylo-oligosaccharides on growth performances and digestive enzyme ac-

