Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

بررسی اثر تجویز خوراکی سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد

حسین گورانی‌نژاد[۱]، نرگس جوادزاده[۲]*، مجتبی علیشاهی[۳]

تاریخ دریافت: شهریور ۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۹۵

چکیده

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی زنده‌ای هستند که از طریق بهبود بار میکروبی روده میزبان، تاثیرات سودمندی را در آن ایجاد کرده، سبب بهبود جذب مواد غذایی از روده می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز خوراکی سطوح پروبیوتیک *Lactobacillus casei* (PTCC1608) بر برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. از این رو، ۴۸۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلا، با وزن متوسط ۵/۵±۳۲/۶ گرم در چهار تیمار با سه تکرار به صورت تصادفی تقسیم شدند (هر تکرار با ۴۰۰ قطعه ماهی). ماهیان تیمارهای A، B و C به ترتیب با جیره‌های غذایی حاوی ۵×۱۰^{۶}، ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۸}CFU/mL *L. casei* به مدت ۶۰ روز غذادهی شدند. یک تیمار نیز به عنوان تیمار شاهد با شرایط کاملا مشابه اما بدون اضافه کردن باکتری به خوراک در نظر گرفته شد. با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، ترپسین و کموترپیسین در روز ۶۰ مشخص شد تیمارهایی که از پروبیوتیک با جیره حاوی ۵×۱۰^{۶}CFU/mL *L. casei* تغذیه شده بودند در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). اما در سایر تیمارهایی که با غلظت‌های دیگر پروبیوتیک تغذیه شده بودند، اختلاف معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). همچنین فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، لیپاز و پروتئاز در تیمارهای که از پروبیوتیک با غلظت‌های ۵×۱۰^{۶} و ۵×۱۰^{۷}CFU/mL استفاده شده بود، افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج این مطالعه، افزودن پروبیوتیک *L. casei* با غلظت ۵×۱۰^{۶}CFU/mL به خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد، به عنوان مناسب‌ترین غلظت، باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلا می‌شود، ولی غلظت‌های بالاتر آن، اثرات منفی بر ماهی قزل‌آلا دارد.

واژگان کلیدی: Lactobacillus casei، Oncorhynchus mykiss، *آنزیم‌های گوارشی، پروبیوتیک.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۲- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.
* نویسنده مسئول: nargesjavadzadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پرورش آبزیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان در محیط‌های مصنوعی پرورشی، می‌تواند تامین کننده بخشی از نیازهای پروتئینی کشور باشد. تولید آبزیان در مقایسه با سایر فرآورده‌های پروتئینی ارزان‌تر و آسان تر بوده، ارزش غذایی آن به مراتب بیشتر از سایر منابع تامین کننده پروتئین حیوانی است (آذری تاکامی، ۱۳۶۳). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی است که به طور گسترده در تمام دنیا پراکنده شده است (Hardy, 1991). ایران نیز به عنوان یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان ماهی قزل‌آلا در آب‌های شیرین جهان مطرح است (Tacon, 1999). بنابراین داشتن آگاهی کامل از نیازهای زیستی این ماهی و شناخت عوامل موثر در رشد، افزایش وزن و میزان مقاومت در برابر شرایط و عوامل محیطی و در نهایت تولید بیشتر در واحد سطح ضروری است. هر روزه مطالعات بیشتری در ارتباط با تغذیه ماهی قزل‌آلا انجام می‌شود و تلاش می‌شود، خوراک با کیفیت بالاتری تولید شود. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که وقتی وارد دستگاه گوارش می‌شوند، در یک تعداد معین، تاثیرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند (Klaenhammer, 2001). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در آبزی‌پروری در راستای استفاده از پروبیوتیک‌ها برای نیل به اهداف گوناگون مانند بهبود رشد، ضریب تبدیل غذایی، پاسخ‌های ایمنی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی انجام گرفته است (Babu et al., 2003; Yanbo and Zirong, 2006; Rengpipat et al., 2008; Merrifield et al., 2009; Son et al., 2009). مدیریت تغذیه در ماهیان پرورشی از مهم‌ترین مسائل تولید به شمار می‌آید. تغذیه آبزیان اغلب بیش از ۵۰ درصد از هزینه‌های تولید را تشکیل می‌دهد. بنابراین، می‌توان با به کار بردن غذای خوب و با کیفیت بالا، قیمت تمام شده تولید را کاهش داد. این امر از طریق بالابردن درصد بقا، کاهش ضریب تبدیل غذایی و کاهش هدر رفتن غذا (شناوری مناسب غذا) انجام‌پذیر است (Mateo, 2005). از این رو ضرورت انجام مطالعات در زمینه‌های مختلف به ویژه تغذیه این گونه با ارزش، بیش از پیش نمایان می‌شود (Li and Gatlin, 2006). با توجه به این که تا به حال مطالعه‌ای درباره اثر پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سطح مزارع پرورشی صورت نگرفته است، از این رو در مطالعه حاضر اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

این پروبیوتیک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

نگه‌داری بچه ماهیان و تیمارها

این پژوهش در مرکز پرورش ماهیان سردابی شرکت زاگرس ماهی واقع در روستای شیمن در ۷۰ کیلومتری شمال شهر ایذه (خوزستان) اجرا شد. آب مورد نیاز این مرکز از فاصله ۳۵۰ متری توسط چشمه روستای شیمن تامین می‌شد.

برای انجام مطالعه حاضر ۴۸۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۵/۵±۳۲/۶ گرم انتخاب شد و ماهیان به استخرهای سیمانی با ابعاد ۲×۲۵ متر و دبی ۳ لیتر در ثانیه انتقال داده شدند. باکتری *Lactobacillus casei* (PTCC1608) نیز که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفت از دانشگاه شهید چمران تهیه شد.

برای تغذیه ماهیان از جیره غذایی تجاری (کارخانه بیضا ۲۱، شیراز) با اندازه ۰/۳±۳ میلی‌متر استفاده شد (حداقل مقادیر پروتئین ۴۰ درصد، چربی ۱۶ درصد، فیبر ۲/۵ درصد و رطوبت ۱۰ درصد). میزان و دفعات غذادهی بر اساس پیشنهاد کارخانه خوراک‌سازی انجام گرفت. به این ترتیب که با توجه به دمای ۱±۱۶ درجه سانتی‌گراد، دفعات غذادهی طی ۴ وعده، ۲ وعده در صبح و ۲ وعده در عصر انجام شد. بعد از یک هفته و سازگار شدن ماهیان با شرایط آزمایش، تغذیه با جیره‌های آزمایشی شروع شد (Webster et al., 1997). ماهیان در ۴ تیمار هرکدام با سه تکرار تقسیم‌بندی شدند، شامل تیمار شاهد که با جیره غذایی بدون مکمل پروبیوتیکی (جیره پایه) و تیمارهای A، B و C که به ترتیب با جیره‌های غذایی حاوی ۵×۱۰^{۶}، ۵×۱۰^{۷} و یا ۵×۱۰^{۸}CFU/mL مکمل *L. casei*، به مدت ۶۰ روز غذادهی شدند (ضیایی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۴). تعداد ۱۲۰۰ قطعه ماهی در هر تیمار مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از تیمارها به صورت کاملا تصادفی و به تعداد ۵ قطعه از هر تکرار (۱۵ قطعه از هر تیمار) بود. از ماهیان در روزهای صفر و ۶۰ برای انجام زیست‌سنجی (اندازه‌گیری طول کل و وزن) و سنجش میزان آنزیم، نمونه‌برداری شد.

نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهی در روز صفر و پس از زیست‌سنجی انجام شد. به این ترتیب که تعداد ۵ قطعه از ماهیان از هر تکرار با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع شده،

www.SID.ir

Archive of SID

سریعا در مجاورت یخ قرار داده شد تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت پذیرد (Chang et al., 2002). دستگاه گوارش ماهیان به کمک ابزار جراحی جدا شد و بعد از پاک کردن باقیمانده غذا، بلافاصله در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (تانک ازت مایع، مدل MDF-U71VC، Sanyo، ژاپن) تا زمان سنجش نگهداری شد (Kuzmina et al., 2010).

استخراج آنزیم

برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، کموتریپسین، آلفا آمیلاز و لیپاز)، یک گرم از بافت امعا و احشا، سریعا پس از خارج کردن از تانک ازت مایع، توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند و قبل از آب شدن کامل یخ آن‌ها، در داخل ظرف مخصوص هموژن قرار داده شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی- حجمی) محلول بافر هموژن بر روی نمونه‌ها ریخته شد و نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (مدل D500، Heidolph Instrument، آلمان) هموژن شدند (Cahu et al., 1999; Rungruangsak-Torrissen et al., 2002).

برای ساخت بافر هموژن به منظور سنجش آنزیم‌های پانکراسی شامل پروتئاز، آلفا آمیلاز، لیپاز، ترپسین و کموترپسین، Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و Triton X-100 ۰/۱ درصد در pH ۷/۸ با هم ترکیب و به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها هموژن شدند (Rungruangsak-Torrissen et al., 2002) نمونه‌های هموژن شده در سانتریوفوژ یخچال‌دار (5415 R، Eppendorf، آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت از سوپرناتانت به دست آمده (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد.

برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول ۵۰ میلی‌مولار، بافر Tris-HCl ۲ میلی‌مولار در pH ۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد (Cahu et al., 1999). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، ۰/۱ مولار کلرید کلسیم به آن‌ها اضافه شد و مجددا ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰g سانتریفوژ شد. از سوپرناتانت به دست آمده برای سنجش آنزیم استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین فعالیت آنزیمی

پس از استخراج آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، ترپسین، کموترپسین و آلکالین فسفاتاز، فعالیت آنزیمی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین فعالیت آلفا آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده شد. نشاسته تحت تاثیر آنزیم تجزیه شده و مالتوز تولید می‌کند که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش است (Bernfeld, 1951; Worthington, 1991). برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده شد. در این روش به بافر Tris-HCl ۰/۸ مولار، محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی‌مولار، معرف تیمول فتالئین ۰/۹ درصد و امولسیون روغن زیتون به عنوان سوبسترا نیاز است (Worthington, 1991). برای سنجش آنزیم پروتئاز نیز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده شد. در این روش از $CaCl_2$ ۰/۱ مولار، تری‌کلرو استیک اسید (TCA)، استاندارد تیروزین، NaOH ۰/۵ مولار، معرف فولین به عنوان سوبسترا و کازئین استفاده شد (Worthington, 1991). برای سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از p- نیتروفنیل فسفات و $MgCl_2$ به عنوان سوبسترا به روش Bessey و همکاران (۱۹۴۶) استفاده شد. برای تعیین فعالیت آنزیم ترپسین از سوبسترای N- آلفا بنزوئیل- L- آرژنین- p نیتروانیلید (BAPNA) استفاده شد. در این روش BAPNA در حضور $CaCl_2$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با عصاره آنزیم انکوبه شد (Erlanger et al., 1961). برای تعیین فعالیت آنزیم کیموتریپسین از N- بنزوئیل- L- تیروزین اتیل استر (BTEE) به عنوان سوبسترا استفاده شد (Hummel, 1959).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار آماری SPSS 20 استفاده شد و داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. همچنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 انجام گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم آمیلاز در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

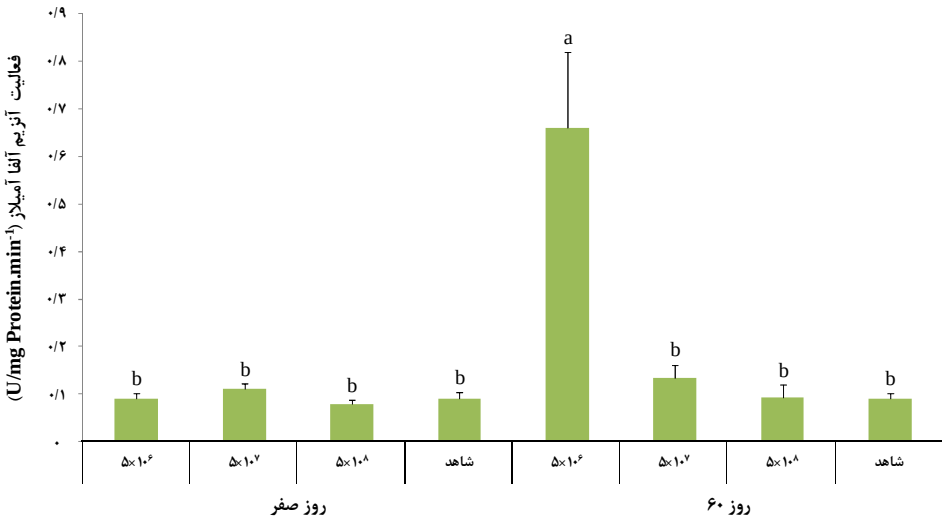
www.SID.ir

Archive of SID

(*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در شکل ۱ آورده شده است. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در روز صفر که هنوز غذادهی با پروبیوتیک آغاز نشده بود، هیچ تفاوتی را بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵).

در روز ۶۰ (انتهای دوره نگهداری) بچه ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی ۵×۱۰^{۶}CFU/mL باکتری *L. casei* (تیمار A) نسبت به تیمار شاهد، بالاترین میزان آمیلاز را داشتند و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در تیمارهای B و C که بچه ماهیان با خوراک‌های حاوی باکتری *L. casei* به میزان ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۸}CFU/mL تغذیه شده بودند، نسبت به گروه شاهد افزایش و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

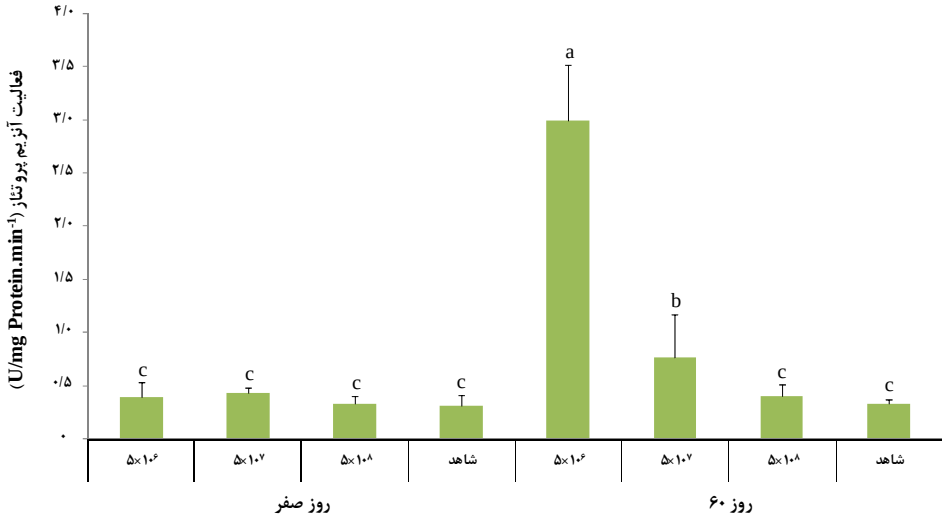
نتایج مربوط به فعالیت آنزیم پروتئاز در شکل ۲ آورده شده است. میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در روز صفر هیچ تفاوتی بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵). در روز ۶۰، بچه ماهیان تیمار شده با خوراک حاوی ۵×۱۰^{۶}CFU/mL باکتری *L. casei* نسبت به تیمار شاهد بالاترین میزان فعالیت پروتئاز را داشتند و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵).



شکل ۱: فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.

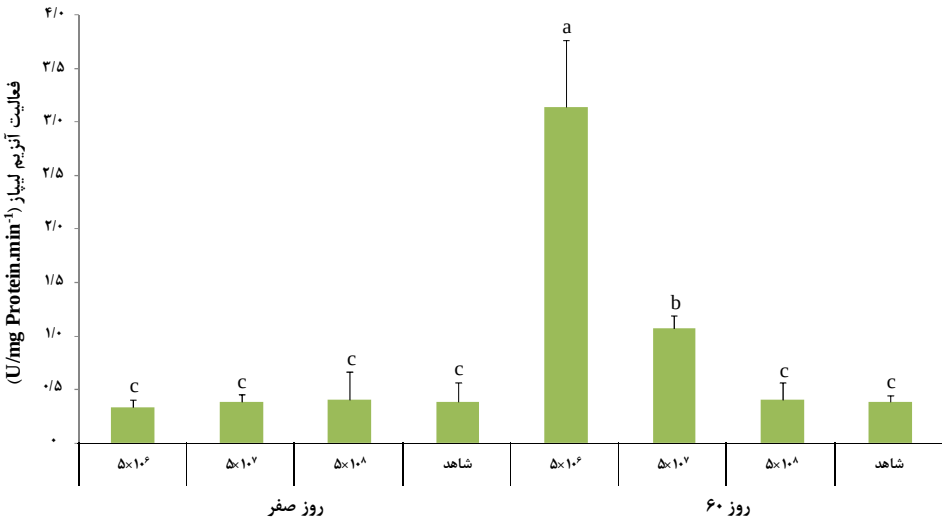
همچنین در بچه ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰۷×۵ CFU/mL باکتری *L. casei* نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم لیپاز در شکل ۳ آورده شده است. میزان فعالیت آنزیم لیپاز در روز صفر هیچ تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵). در روز ۶۰، بچه ماهیان تیمار شده با خوراک حاوی ۱۰۶×۵CFU/mL باکتری *L. casei* نسبت به تیمار شاهد بالاترین فعالیت آنزیم لیپاز را داشتند و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در بچه ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰۷×۵CFU/mL باکتری *L. casei* نیز نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).

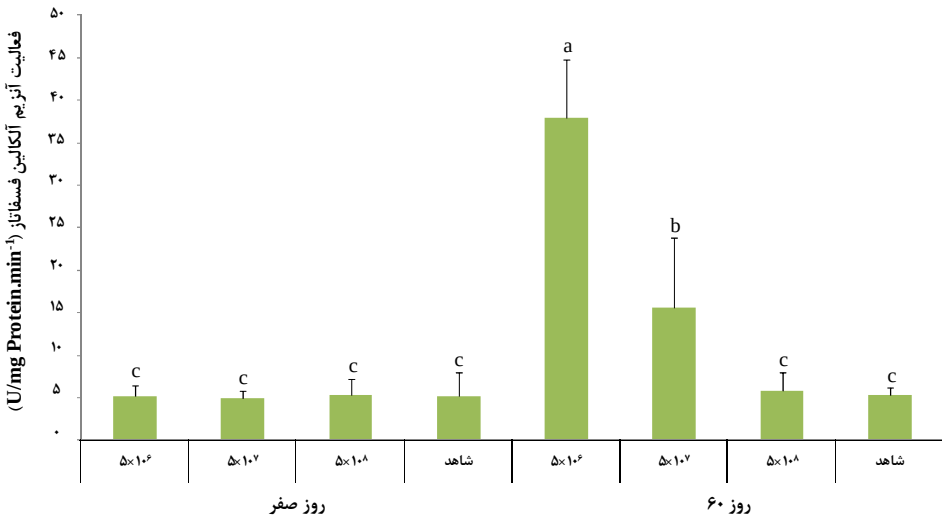
نتایج به دست آمده از ارزیابی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در پایان دوره آزمایشی، در تیمارهای تغذیه شده با خوراک حاوی باکتری *L. casei* به میزان ۱۰۶×۵ و ۱۰۷×۵CFU/mL به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. با این حال بیشترین میزان فعالیت در تیمار تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰۶×۵CFU/mL باکتری *L. casei* مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.



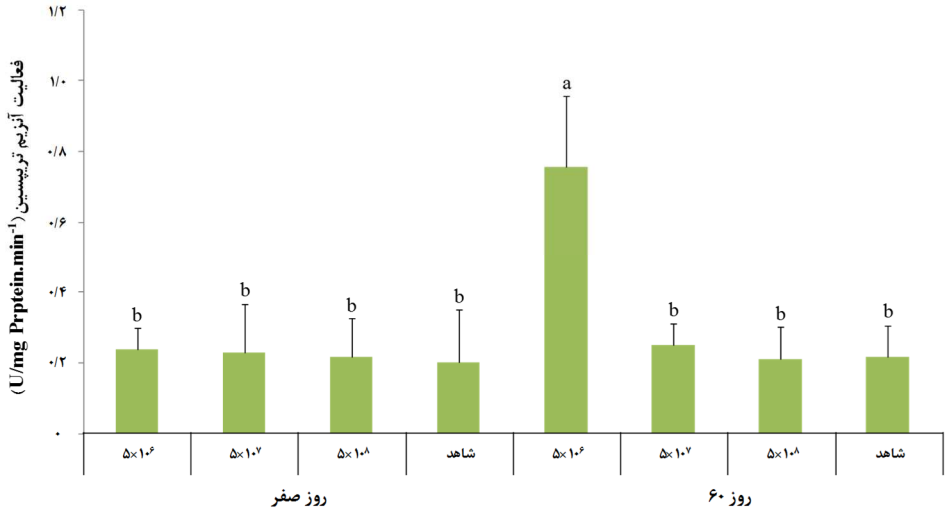
شکل ۴: فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج نشان داد که میزان فعالیت ترپسین تحت تاثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار داشت، به طوری که در روز ۶۰ آزمایش، بیشترین فعالیت آنزیم ترپسین مربوط به بچه ماهیان تیمار شده با خوراک حاوی ۵×۱۰^{۶}CFU/mL باکتری *L. casei* بود که با سایر تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). هرچند بین سایر تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵؛ شکل ۵).

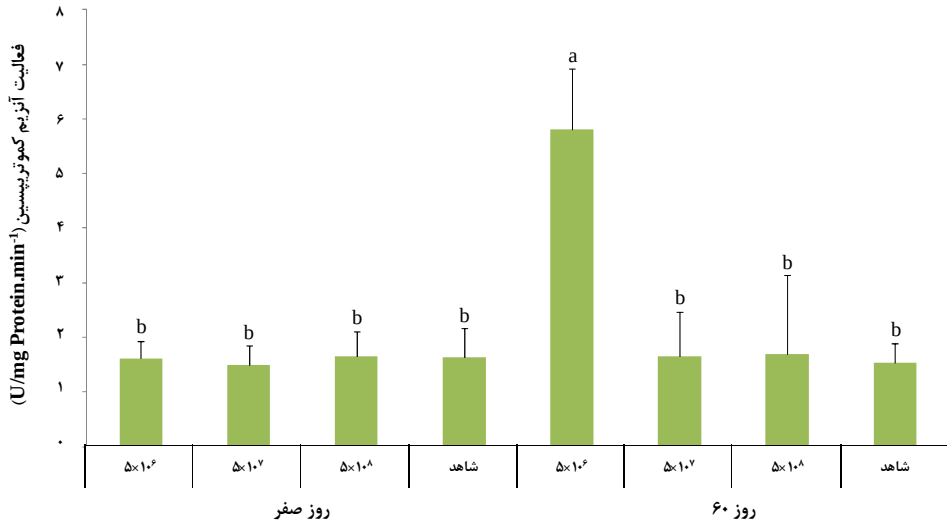
نتایج مربوط به فعالیت آنزیم کموتریپسین که در شکل ۶ آورده شده است، نشان داد که فعالیت کموترپسین تحت تاثیر تیمارهای پروبیوتیکی بود، به طوری که در روز ۶۰ آزمایش، بیشترین فعالیت آنزیم کموترپسین مربوط به تیمار تغذیه شده با خوراک حاوی ۵×۱۰^{۶}CFU/mL باکتری *L. casei* بود که با سایر تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). هرچند بین سایر تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵؛ شکل ۶).



شکل ۵: فعالیت آنزیم ترپسین در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: فعالیت آنزیم کموتریپسین در تیمارهای مختلف با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در روزهای صفر و ۶۰ آزمایش (میانگین ± انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌داری آماری است.

بحث

پروبیوتیک‌ها به صورت مکمل‌های غذایی باکتریایی با اثر بر تعادل فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان می‌گذارند (Fuller, 1987). طبق نظر پژوهشگران، یکی از عملکردهای اصلی و سودمند پروبیوتیک‌ها در موجودات زنده، بهبود تغذیه میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی و مکمل‌های رشد و در نتیجه افزایش بقا و بازده غذایی، جلوگیری از اختلالات روده‌ای و پیش هضم عوامل تغذیه‌ای موجود در مواد تشکیل دهنده غذا است. از میان فواید پروبیوتیک‌ها می‌توان به اثرات مثبت آن‌ها در ارتقای سلامت و بهبود بقای میزبان اشاره کرد (Wang et al., 2008). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus casei* مورد استفاده با غلظت ۵×۱۰^{۶}CFU/mL در تیمار A تا روز ۶۰ دوره پرورشی باعث بهبود عملکرد رشد و تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد شد، به طوری که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P<۰/۰۵$). این بهبود رشد می‌تواند به علت تاثیر مثبت این باکتری بر فلور دستگاه گوارش و افزایش میزان هضم و جذب

www.SID.ir

Archive of SID

غذای مصرفی باشد. پژوهش‌های متعددی که در این زمینه صورت گرفته‌اند بیانگر این مسئله هستند که افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی انواع ماهیان، رشد آن‌ها را افزایش می‌دهد که این موضوع منطبق با نتیجه مطالعه حاضر است. هم‌راستا با نتایج این مطالعه، Staykov و همکاران (۲۰۰۷) اثرات الیگوساکارید مانان به دست آمده از پروبیوتیک مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در بهبود عملکرد رشد، بازماندگی و افزایش ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دو سیستم پرورش در قفس و کانال‌های دراز را گزارش کردند. در مطالعه دیگری مشخص شد که پروبیوتیک‌های تجاری *Bacillus subtilis* CH201 و *B. licheniformis* CH200 قادر به بهبود درصد بقا، ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی و افزایش تعداد *Bacillus*های دستگاه گوارش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند (Bagheri et al., 2008). گزارش‌ها در مورد پروبیوتیک‌های مخمری نیز مختلف است، Adamek و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۳۷ روز با جیره غذایی حاوی ۰/۶۲ و ۲/۵ گرم پروبیوتیک آسکوژن در هر کیلوگرم غذا، رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای را افزایش داد. در جیره غذایی حاوی ۰/۶۲ گرم آسکوژن، ۸/۹ درصد افزایش رشد و ۹ درصد افزایش نرخ رشد ویژه (نسبت به ماهیان شاهد) مشاهده شد. این مقادیر در مورد جیره ۲/۵ گرم آسکوژن، به ترتیب ۱۰/۵ و ۱۳ درصد بود، اما در جیره ۵ گرم آسکوژن بر کیلوگرم غذا، کاهش رشد مشاهده شد که باز هم منطبق با مطالعه حاضر است. نتایج حاصل از تاثیر استفاده از پروبیوتیک *L. casei* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلا بر فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، تریپسین و کموتریپسین نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین بچه ماهیان تیمار شده با خوراک حاوی 5×10^{6}CFU/mL باکتری *L. casei* و تیمار شاهد در روز ۶۰ بود ($P<0/05$). همچنین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، لیپاز و پروتئاز نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در تیمار با خوراک حاوی باکتری *L. casei* به میزان 5×10^{6} و 5×10^{7}CFU/mL نسبت به تیمار شاهد در روز ۶۰ بود ($P<0/05$). در تیمارهای تغذیه‌ای، ماکرومولکول‌هایی مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های جیره در فعالیت آنزیم‌های گوارشی موثر هستند. در این مطالعه، برای مقایسه مکمل‌های پروبیوتیکی و گروه شاهد، در فرمولاسیون جیره‌ها از مواد مغذی با انرژی یکسان استفاده شد. همچنین Wang و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران (۲۰۰۸) اثر استفاده از مکمل پروبیوتیکی را بر میگوی *Penaeus vannamei* مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها حاکی از عدم تاثیرگذاری مکمل غذایی بر آنزیم گوارشی کموترپسین بود. تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، افزایش فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، بهبود تعادل میکروبی روده و در نتیجه بهبود هضم و جذب مواد غذایی تحت تاثیر قرار می‌دهند (Suzer et al., 2008). به همین ترتیب تاثیر پروبیوتیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بررسی‌های پژوهشگران مختلف بر روی آبزیان دیده شده است (پورامینی و حسینی، ۱۳۸۶؛ Soleimani et al., 2012). بنابراین باکتری‌های ذکر شده با شرکت در فرآیند هضم، کارایی دستگاه گوارش را افزایش و در نهایت موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شوند. نتایج پژوهش‌هایی که در آن‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده شده، نشان داده است که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند (Wang and Xu, 2006). با توجه به این که میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی به مراحل رشد، میزان غذا، ترکیب شیمیایی و نیازهای تغذیه‌ای آبزی بستگی دارد (Ahmadnia Motlag et al., 2012). احتمالا وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم لیپاز و آلفا آمیلاز بین تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد به دلیل ترکیب شیمیایی غذا و زیاد بودن میزان چربی و کربوهیدرات غذاهای مصرفی و تحریک زیاد دستگاه گوارش به تولید آنزیم لیپاز و آلفا آمیلاز نسبت به آنزیم‌های تریپسین و کموتریپسین باشد. دلیل کاهش کموترپسین می‌تواند عدم توانایی تولید کموترپسین به صورت خارج سلولی توسط باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش و یا عدم تحریک سیستم دستگاه گوارش به تولید این آنزیم‌ها به شکلی موثر باشد. ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب برای مقایسه ضریب رشد ماهی، پذیرش غذا و همچنین ظرفیت گوارشی، مورد استفاده واقع شود. با توجه به تولید آنزیم‌های گوارشی توسط دستگاه گوارش بچه ماهیان و تحریک و تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شده در این آزمایش، نمی‌توان سهم فعالیت آنزیمی ناشی از فعالیت باکتری‌ها و تولید آنزیم توسط خود بچه ماهیان را تفکیک کرد (Suzer et al., 2008). بهبود شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

L. plantarum و *L. casei* احتمالا به دلیل بهبود فعالیت‌های گوارشی به وسیله سنتز ویتامین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌ها مرتبط است که منجر به بهبود هضم‌پذیری می‌شود (Son et al., 2009). در روز صفر، پروبیوتیک *L. casei* کمترین عملکرد فعالیت آنزیمی را داشت. چرا که تاثیرات معنی‌داری بر روی آنزیم‌هایی مانند آلفا آمیلاز، پروتئاز، آلکالین فسفاتاز، لیپاز و ترپسین نداشت. اما پس از دوره ۶۰ روزه، آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، لیپاز و پروتئاز بیشترین تغییر فعالیت را داشتند که دلیل آن را می‌توان به عملکرد بهتر پروبیوتیک *L. casei* بر آنزیم‌های گوارشی مرتبط دانست.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد *L. casei* به میزان ۵×۱۰^{۶}CFU/mL در خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد، به عنوان مناسب‌ترین غلظت، باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلا شد، ولی غلظت‌های بالاتر این پروبیوتیک اثرات منفی بر ماهی قزل‌آلا داشت.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان داشت که استفاده از پروبیوتیک *L. casei* باعث بهبود فعالیت و ترشح آنزیم‌های گوارشی می‌شود. بنابراین می‌توان از این پروبیوتیک به عنوان کاندیدای مناسب برای بهبود و تسریع فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای کشور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای مهندس تقوی مسئول محترم آزمایشگاه سرم‌سازی رازی به واسطه همکاری‌های صمیمانه در طول انجام این پژوهش، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

آذری تاکامی ق. ۱۳۶۳. اصول تکثیر و پرورش ماهی. انتشارات وزارت کشاورزی. معاونت شیلات و آبزیان. ۱۶۷ص.

پورامینی م. و حسینی‌فر ح. ۱۳۸۶. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. انتشارات موج سبز. ۱۰۴ص.

ضیایی‌نژاد س.، رفیعی غ.، میرواقفی ع. و فرحمند ح. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در شاخص‌های رشد، بازماندگی و فلور میکروبی دستگاه گوارش لارو ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) با شیوه‌های رسانش مختلف. شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۸(۲): ۲۹۸-۲۸۷.

Adamek Z., Hamackova J., Kouril J., Vachta R. and Stibranyiova I. 1996. Effect of Ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wels (*Silurus glanis*) under conditions of intensive culture. Krmiva (Zagreb), 38(1): 11–20.

Ahmadnia Motlag H.R., Farhangi M., Rafiee G.H. and Noori F. 2012. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Aquaculture International, 20(4): 693–705.

Babu S.M., Banerjee C.S. and Abraham T.J. 2003. Effect of gram positive bacterium, *Lactobacillus* sp. on the growth performance of gold fish, *Carassius auratus* Linnaeus, 1758. Environmental Ecology, 21: 17–19.

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

Bernfeld P. 1951. Amylases α and β. P: 149–157. In: Colowick P. and Kaplan N.O. (Eds.). Methods in Enzymology, Vol. 1. Academic Press, New York.

Bessey O.A., Lowry O.H. and Brock M.J. 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. Journal of Biological Chemistry, 164: 321–329.

Cahu C.L., ZamboninoInfante J.L., Quazuguel P. and LeGall M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax*

www.SID.ir

Archive of SID

larvae. Aquaculture, 171: 109–119.

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, *Symphysodonaegui fasciata*. Aquaculture, 203: 321–333.

Erlanger B.F., Kokowsky N. and Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95: 271–278.

Fuller R. 1987. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365–378.

Hardy R.W. 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. P: 105–121. In: Wilson R.P. (Ed.). Handbook of Nutrient Requirement of Finfish. CRC Press. USA.

Hummel B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determinations of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 1393–1399.

Klaenhammer T.R. 2001. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press. Washington D.C, USA. 1118P.

Kuzmina 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, 37: 605–611.

Li P. and Gatlin D.M. 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. Aquaculture, 251: 141–152.

Mateo C.D. 2005. Aspects of nucleotide nutrition in pigs. Ph.D Thesis, South Dakota State University, USA. 171P.

Merrifield D.L., Bradley G., Baker R.T.M. and Davies S.J. 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. Aquaculture Nutrition, 16(5): 496–503.

Rengpipat S., Rueangruklikhit T. and Piyatiratitivorakul S. 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture Research, 39: 134–143.

Rungruangsak-Torrissen K., Rustad A., Sunde J., Eiane S.A., Jensen H.B., Opstvedt J., Nygard E., Samuelsen T.A., Mundheim H. and Luzzana U. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82: 644–654.

www.SID.ir

Archive of SID

Soleimani N., Hoseinifar S.H., Merrifield D.L., Barati M. and 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(2): 316–321.

Son V.M., Chang C., Wu M., Guu Y., Chiu C. and Cheng W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, 26: 691–698.

Staykov Y., Spring P., Denev S. and Sweetman J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International, 15: 153–161.

Suzer C., Coban D., Kamaci H.O., Saka S., Firat K., Otgucuoglu O. and Kucuksari H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae: Effects on growth. Aquaculture, 280: 140–145.

Tacon A.G.J. 1999. Trends in global aquaculture and aquafeed production: 1984-1996 highlights. P: 107–122. In: Brufau J., Tacon A. (Eds.). Feed Manufacturing in the Mediterranean Region: Recent Advances in Research and Technology. CIHEAM (Cahiers Options Mediterraneennes), Zaragoza, Spain.

Wang Y.B. and 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.

Wang Y.B., Tian Z., Yao J. and Li W. 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203–207.

Webster C.D., Tru L.G. and Tidewell J.H. 1997. Growth and body composition of channel catfish (*Ictaharus punctatus*) fed diets containing various percentage of canola meal. Aquaculture. 150: 103–113.

Worthington C.C. 1991. Enzymes Related Biochemicals, Manual. Freehold, New Jersey. 216P.

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, 127: 283–292.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 4, Winter 2017

Effect of different levels of *Lactobacillus casei* as probiotic on some digestive enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings

Hossein Gooraninejad[1], Narges Javadzadeh[2]*, Mojtaba Alishahi[3]

Received: August 2016 Accepted: December 2016

Abstract

Probiotics are generally defined as live microbial food supplement which improve the balance of the host animal's intestinal flora and the absorption of nutrients from the intestine. The aim of this study was to evaluate the effect of different levels of *Lactobacillus casei* (PTCC1608) on some digestive enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Four thousand eight hundred fingerlings (average weight 32.6±5.5g) were randomly divided into 4 groups with three replicates (each with 400 fish). The control group fed with basal diet and the other groups were fed with 5×10^6 (A), 5×10^7 (B) and 5×10^8(C) CFU/mL *L. casei* for 60 days. Activities of digestive enzymes were examined at 0 and 60 days of study. Results showed significantly increased intestine enzymes (α-amylase, trypsin, chemotrypsin) of rainbow trout ($P<0.05$) at 5×10^6CFU/ml concentration on day 60 compared to the control group, however on day 60, no difference between other treatments and control group was observed ($P>0.05$). Alkaline phosphatase, lipase and protease activity at 5×10^6 and5×10^7CFU/mL concentration on day 60 showed significantly difference compared to the control group ($P<0.05$). These results suggest that dietary supplementation of food with *L. casei* at 5×10^6CFU/mL concentration is suitable for enhancing the digestive enzymes activity of *O. mykiss* but higher concentrations of these probiotics have negative effects on *O. mykiss*.

Key words: Oncorhynchus mykiss, Lactobacillus casei, *Intestinal Enzyme*, *Probiotic*.

1- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
3- Associate Professor in Department of Clinical Sciences, University of Shahid Chamran, Ahvaz, Iran.
*Corresponding Author: nargesjavadzadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir