فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۴

تاثیر سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو بر پارامترهای رشد، بقا، آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای ایمنی موکوس ماهی سوروم (*Heros severus*)

پگاه قشلاقی[۱]، قاسم رشیدیان[۲]، الهه چهارده بالادهی[۳]، طاهره باقری[۴]*، حامد غفاری فارسانی[۵]

تاریخ دریافت: فروردین ۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۴

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره بر عملکرد رشد و بهره‌وری غذایی، بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی از پارامترهای ایمنی موکوس بچه ماهیان سوروم انجام شد. آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب ۱ گروه شاهد (۰ گرم سین‌بیوتیک) و ۵ تیمار آزمایشی، شامل سطوح ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره، هر گروه با ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۵ قطعه بچه ماهی، به مدت ۶۰ روز انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن بیش از یک گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره تاثیر معناداری بر پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی داشت (P<۰/۰۵). ماهیان تغذیه شده با مکمل غذایی بایومین‌ایمبو تغییرات معنی‌داری را در پارامترهای ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست شامل لیزویم، پروتئین کل و فسفاتاز قلیایی نشان دادند (P<۰/۰۵). نتایج بررسی آنزیم‌های گوارشی نشان داد که به جز سطح ۰/۵ گرم سین‌بیوتیک، در سایر تیمارها فعالیت اختصاصی آنزیم پروتئاز، لیپاز، فسفاتاز و آمیلاز قلیایی افزایش یافت (P<۰/۰۵)، به طوری که بالاترین سطح آنزیم پروتئاز، لیپاز، فسفاتاز و آمیلاز قلیایی به ترتیب در گروه‌های تغذیه شده با سطح ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۲/۵ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو مشاهده شد (P<۰/۰۵). بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سین‌بیوتیک بایومین ایمبو تاثیرات سودمندی بر متابولیسم و رشد ماهی سوروم داشته و همچنین باعث افزایش سطح ایمنی بچه ماهیان شده است که قدرت بقای این بچه ماهیان را افزایش می‌دهد و در مجموع سطح ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره غذایی این گونه پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: *ایمنی موکوس، سین‌بیوتیک، سوروم، ماهی زینتی.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ایران.
۲- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد بوم‌شناسی آبزیان، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۴- دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۵- دانشجوی دکتری، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، ایران.
* نویسنده مسئول: bagheri1360@gmail.com

مقدمه

در بخش‌های مختلف آبزی‌پروری بهبود و افزایش سرعت رشد ماهیان و همچنین بهبود کیفیت سلامت و کاهش تلفات در دوره‌های مختلف زندگی آن‌ها، به خصوص در مورد بچه ماهیان که حساسیت بالاتری دارند از طریق بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش به وسیله افزودن مکمل‌های غذایی مثل پری‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها همواره دارای اهمیت بوده است (Gatesoupe, 1999; Venkat et al., 2004; Balcazar et al., 2006; Subharanjani et al., 2015).

سین‌بیوتیک‌ها ترکیبات سازگار با محیط زیست هستند که به صورت کلی از دو جزء شامل یک بخش پری‌بیوتیک (ترکیبات کربوهیدراتی غیر قابل هضم ولی قابل تخمیر که عمدتاً از الیگوساکاریدها هستند) و یک بخش پروبیوتیک (شامل میکروارگانیسم‌های اسید لاکتیکی زنده و غیرزنده‌ای که عمدتاً قابلیت تخمیر دارند و باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش میزبان می‌شوند) تشکیل شده‌اند (Ai et al., 2011; Cerezuela et al., 2012). مزیتی که سین‌بیوتیک‌ها نسبت به اجزای تشکیل دهنده خود به صورت مجزا دارند این است که قرار گرفتن ترکیبات پروبیوتیک و پری‌بیوتیک در کنار یکدیگر باعث ایجاد یک اثر هم افزایی می‌شوند که به مراتب تاثیر بیش‌تری بر گونه میزبان خواهد داشت. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ترکیبات سین‌بیوتیک با تاثیر بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی گونه آبزی از طریق مکانیسم‌های مختلف، بهبود رشد و وضعیت سلامت میزبان را به دنبال دارند. همچنین از طرف دیگر این موضوع به اثبات رسیده است که سین‌بیوتیک‌ها می‌توانند با بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش و تاثیر بر بافت‌های لمفوئیدی نقش تحریک سیستم ایمنی را در بدن میزبان بازی کنند (Geraylou et al., 2013; Zhang et al., 2014).

نسبت به ترکیبات پری‌بیوتیک و پروبیوتیک مطالعات نسبتاً کم‌تری در مورد اثر سین‌بوتیک‌های مختلف بر روی آبزیان به ویژه ماهیان زینتی انجام شده است. سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو از پروبیوتیک *Enterococus faecium* IMB52 (DSM530) و پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید[1] تشکیل شده است.

1- Fructo-oligosaccharid

فروکتوالیگوساکارید به عنوان بخش پری‌بیوتیکی از ترکیبات کربوهیدراتی غیرقابل هضم ولی قابل تخمیر هستند که در دستگاه گوارش میزبان از جمله آبزیان می‌تواند به عنوان سوبسترا و مواد غذایی برای باکتری‌های تخمیر کننده مورد استفاده قرار گیرند. در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است که فروکتوالیگوساکارید از طریق تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش می‌تواند باعث بهبود کارایی تغذیه و افزایش رشد شود (Wu et al., 2013, Akrami et al., 2013). *Enterococus faecium* از گونه‌های باکتریایی غیربیماری‌زای تخمیر کننده است که در دستگاه گوارش توانایی تخمیر فروکتوالیگوساکارید و تولید متابولیت‌های فرا سودمندی را دارد. با اضافه کردن پروبیوتیک *Enterococus faecium* به جیره آبزیان مشخص شد که استفاده از این باکتری تخمیر کننده در جیره آبزیان باعث بهبود پارامترهای رشد و ایمنی می‌شود (Chang and Liu, 2002; Wang et al., 2008). در مطالعه‌ای که بر روی سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو انجام گرفت، مشخص شد که سطوح ۰/۵ و ۱/۵ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره به طور معناداری باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش پارامترهای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به گروه شاهد شد (Mehrabi et al., 2012). همچنین در مطالعه مازندرانی (۱۳۹۱) مشخص شد که میزان ۱/۵ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره بیش‌ترین اثر را بر پارامترهای رشد و بقا ماهی کپور وحشی داشت.

ماهی‌ها جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا بیش‌تر به سیستم دفاع غیراختصاصی خود به ویژه در دوران لاروری که سیستم دفاع اختصاصی به خوبی توسعه نیافته است، وابسته هستند (Ellis 2001; Magnadottir, 2006). موکوس پوست یکی از اولین سطوح دفاعی ماهیان است که دارای پارامترهای ایمنی متفاوت از جمله انواع آنزیم‌ها و پروتئین‌ها است (Subramanian et al., 2007). مطالعات پیشین به خوبی نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های غذایی مثل پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند بهبود سیستم ایمنی از جمله افزایش سطح فعالیت پارامترهای ایمنی موکوس را به همراه داشته باشند که این به نوبه خود باعث افزایش مقاومت به انواع عوامل بیماری‌زا و انواع تنش‌های محیطی می‌شود و افزایش بقای

ماهیان کلمه، شمشیری و سفید را در طی دوره پرورش به دنبال دارد (Hoseinifar et al., 2014, 2015; Ghehdarijani et al., 2015).

استفاده از مکمل‌های غذایی دوست‌دار محیط زیست از جمله پری‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها جهت تسریع در رشد و همچنین بهبود وضعیت متابولیسم و ایمنی آن‌ها جهت مقابله با انواع پاتوژن‌ها، یکی از موضوعات مورد علاقه در بحث پرورش بچه ماهیان است. مطالعات پیشین به خوبی نشان داده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیکی و همچنین پری‌بیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی باعث بهبود متابولیسم مواد غذایی و در نتیجه افزایش رشد و همچنین بهبود وضعیت ایمنی می‌شوند (Tinh et al., 2008; Wang et al., 2008; Nayak, 2010a; Soleimani et al., 2012; Mehrabi et al., 2012). نتایج مطالعات گذشته نیز این نکته را به روشنی نشان داده‌اند که استفاده همزمان از باکتری‌های پروبیوتیکی و پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند اثر هم‌افزایی بر پارامترهای مورد نظر گونه میزبان داشته باشند (Ai et al., 2011).

بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثر سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو بر پارامترهای رشد و بقاء، آنزیم‌های گوارشی و همچنین پارامترهای ایمنی موکوس بچه ماهیان سوروم انجام شد. از این رو با توجه به این موارد، استفاده از مکمل‌های غذایی مناسب که بتوانند بهبود متابولیسم مواد غذایی، افزایش رشد و تقویت خط دفاعی را در ماهیان به ویژه لاروها و بچه ماهیان که هنوز سیستم ایمنی به شکل کامل توسعه پیدا نکرده است را به دنبال داشته باشند می‌تواند به طور موثری از هزینه‌های اضافی مربوط به تغذیه و همچنین تلفات به علت بیماری و در نتیجه ضرر و زیان‌های اقتصادی جلوگیری کند. بنابراین هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو بر پارمترهای رشد و بهره‌وری غذایی، آنزیم‌های گوارشی و همچنین پارامترهای ایمنی موکوس ماهی سوروم که ارزش تجاری زیادی در صنعت ماهیان زینتی دارد، است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش و سیستم پرورش

در این آزمایش تعداد ۲۷۰ قطعه بچه ماهی سوروم (*Heros severus*) با میانگین وزن و طول اولیه ۱/۶۹±۰/۰۴ گرم و ۰/۵۵±۰/۰۲ سانتی‌متر در شش گروه

آزمایشی، هر گروه با سه تکرار به مدت ۸ هفته در کارگاه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی آب شیرین واقع در شهرستان قائم‌شهر مورد تغذیه قرار گرفتند. هر تکرار شامل یک آکواریوم مجزا با ظرفیت ۶۰ لیتر بود و ۱۵ قطعه بچه ماهی در هر آکواریوم قرار داده شد. آکواریوم‌ها با آب فاقد کلر آبگیری شده بودند و توسط یک سنگ هوا که به پمپ هوای مرکزی متصل بود هوادهی می‌شدند. جهت انجام این آزمایش از ماهیان تولیدی در کارگاه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شهرستان قائم شهر استفاده شد. ماهیان سالم از لحاظ ظاهری از ۱۴ روز قبل به منظور سازگاری با شرایط و همچنین واحدهای آزمایشی از سالن مرکزی کارگاه به اتاق آزمایش منتقل شدند. در طی دوران سازگاری بچه ماهیان تمام گروه‌ها با غذای پایه تجاری بدون مکمل غذایی به میزان ۵ درصد وزن بدن در ۳ وعده با جیره تجاری شرکت بیومار[1] (BioMar) سایز ۱ تغذیه شدند. در طول دوره آزمایش که به مدت ۶۰ روز بود، شرایط دوره نوری بر اساس ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم شد و بچه ماهیان در نیمه اول دوره پرورش همچنان به میزان ۵ درصد وزن بدن و در نیمه دوم دوره پرورش به میزان ۴ درصد با جیره‌های آماده شده تغذیه شدند (پورداوود و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین در طی دوران آزمایش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی غذا

جهت آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومن ایمبو[2] (ساخت شرکت BIOMIN، ایتالیا)، مقادیر مورد نظر از این سین‌بیوتیک برای هر گروه آزمایشی به جیره تجاری پایه (شرکت بیومار) با ترکیب شیمیایی مشخص (جدول ۱) اضافه شد. سپس توسط آسیاب برقی به صورت خشک کاملاً آسیاب و به پودر یکنواخت تبدیل شد و چندین مرحله به همین شکل کار ادامه داده شد تا این که سین‌بیوتیک به خوبی با جیره میکس شد. لازم به توضیح است که پس از آسیاب جیره ویژه هر تیمار، قسمت‌های داخلی آسیاب خارج و پس از شستشو خشک شد و برای آسیاب جیره تیمار بعد مورد استفاده قرار گرفت.

1- BioMar

2- Synbiotic Biomin IMBO®

جدول ۱: ترکیب شیمیایی جیره پایه

ترکیب غذایی	مقدار
پروتئین	۴۸/۳٪
چربی	۱۴/۷٪
فیبر	۰/۵-۰/۳٪
خاکستر	۹/۴٪
انرژی قابل هضم	۴۶۵۰(MJ/Kg)
انرژی خالص	۵۲۲۶(MJ/Kg)

پس از این که یک مخلوط یکنواخت از جیره پودر شده و مکمل غذایی به دست آمد به اندازه کافی آب ولرم استریل شده به مخلوط مورد نظر اضافه شد تا یک خمیر یک‌دست تهیه شود و در نهایت با چرخ گوشت برقی (چشمه بسیار ریز) با قطر سوراخ ۱/۵ میلی‌متر جهت تهیه پلیت‌هایی غذایی چرخ شد. همچنین در اتاقک تغذیه دو عدد لامپ استریلیزه کننده با اشعه ماوراء بنفش (۳۶ وات) تعبیه شده بود که در فواصل زمانی مشخص جهت کاهش بار آلودگی میکروبی اتاقک از آن‌ها استفاده می‌شد. همچنین در این اتاقک ضدعفونی دستگاه‌ها و میز خشک کننده هوا با الکل ضد عفونی می‌شدند پلیت‌های تهیه شده در دمای اتاق در محیط عاری از آلودگی در معرض جریان هوا قرار داده شدند تا خشک شوند (رطوبت < ۰/۱۳ درصد) و در نهایت در بسته‌های پلاستیکی بسته‌بندی شدند و در یخچال در دمای ۴ درجه تا زمان مصرف نگه‌داری شدند.

پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی

در طول دوره آزمایش جهت محاسبه میزان صحیح غذای مورد نیاز هر مخزن پرورش و همچنین محاسبه پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی در فواصل زمانی هر دو هفته یک‌بار زیست‌سنجی ماهیان انجام می‌شد. در هر دوره زیست‌سنجی، فاکتورهای طول کل و همچنین وزن کل ماهیان توسط خط‌کش مدرج و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. سایر پارامترهای رشد از جمله درصد افزایش وزن (WG%)، شاخص رشد روزانه (SGR)، شاخص وضعیت (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و همچنین نسبت کارایی پروتئینی (PER) و در نهایت میزان بقای بچه ماهیان بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Ai et al., 2011):

$$WG\ (\%) = [(W_f - W_i)/W_i] \times 100$$

$$SGR = [(\ln W_f - \ln W_i)/t] \times 100$$

W_f: وزن نهایی (g)؛ W_i: وزن اولیه (g)؛ t: زمان (بر حسب روز).

FCR = میزان افزایش وزن(g)/کل غذای داده شده(g)

نرخ بقا (٪) = (تعداد نهایی/تعداد اولیه)×۱۰۰

سنجش آنزیم‌های گوارشی

در انتهای دوره تغذیه، قبل از نمونه‌برداری، برای اطمینان از خالی بودن روده، ماهیان همه تیمارها از ۲۴ ساعت قبل قطع غذادهی شدند. از هر تکرار سه قطعه ماهی به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شد و جهت آسان‌کشی و مرگ سریع، ماهیان در عصاره گل میخک با دز بالا (۲۰۰ میلی گرم در لیتر بر اساس Yar-Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴)) قرار داده شدند. سپس در مجاورت یخ کالبدگشایی شدند. مجرای گوارشی ماهیان از ابتدا تا انتها از سایر قسمت‌ها جدا شد. چربی‌های اطراف دستگاه گوارش نیز جدا شده و دور انداخته شد. مجرای گوارشی جداسازی شده از ماهیان هر تکرار با آب مقطر خنک شستشو داده شد و در مخزن ازت مایع سریع منجمد شد و تا زمان استفاده برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. از آنجایی که برای سنجش آنزیم‌های گوارشی نیاز بود که قطعات دستگاه گوارشی یکنواخت شوند و عصاره حاوی آنزیم‌های گوارشی جداسازی و برای سنجش مورد استفاده قرار گیرد، نمونه‌های به دست آمده از هر تکرار (۳ نمونه از هر تکرار) برای هموژنایز شدن مناسب و به دست آمدن مقدار کافی از عصاره حاوی آنزیم‌های گوارشی، با یکدیگر مخلوط شدند. بدین منظور، در مجاورت یخ هر سه مجرای گوارشی به دست آمده از هر تکرار در یک لوله فالکون قرار داده شد و به نسبت وزنی به حجمی (W/V) ۵ برابر (۱/۵) به آنها محلول نمکی (کلرید سدیم) ۰/۲ مولار اضافه شد سپس توسط یک دستگاه یکنواخت کننده یا هموژنایزر (IKA T25 Digital, Ultra Turrax Model) به خوبی یکنواخت شدند. برای جداسازی عصاره‌های خام حاوی آنزیم‌های گوارشی، مخلوط‌های یکنواخت شده با دور g ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس فاز بالایی جهت سنجش آنزیم‌های گوارشی جداسازی و به تیوپ‌های تمیز انتقال داده شد و تا زمان استفاده در یخچال ۸۰- نگه‌داری شدند (Hidalgo et al. 1999). برای سنجش آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز، پروتئاز، نمونه‌ها به آزمایشگاه تشخیص طبی سینا (شهرستان قائم‌شهر) ارسال شدند.

فعالیت آنزیمی پروتئاز کل بر اساس هیدرولیز کازئین به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. در این روش مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۱٪ (وزنی/ حجمی) کازئین در آب (۰/۲۵ میلی‌لیتر)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر بافر و ۰/۱ میلی‌لیتر

نمونه آنزیمی بود که به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۰/۶ میلی‌لیتر از ۸٪ (وزنی/ حجمی) تری‌کلراستیک اسید متوقف شد و پس از نگه‌داری به مدت یک ساعت، در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و قسمت بالایی جداسازی شد و برای سنجش آنزیم میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. در این روش تیروزین به عنوان استاندارد استفاده شد (Hidalgo et al., 1999). فعالیت آنزیم آمیلاز دستگاه گوارش بر اساس روش توضیح داده شده توسط Bernfeld (۱۹۵۵) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده شد و جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد (Bernfeld, 1955). سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در دستگاه گوارش بر اساس روش Worthington (۱۹۸۸) انجام شد. در این روش میزان فعالیت آنزیم لیپاز بر اساس میزان آزادسازی اسیدهای چرب حاصل از هیدرولیز تری‌گلیسیرید مورد ارزیابی قرار گرفت (Worthington 1988). میزان فسفاتاز قلیایی دستگاه گوارش بر اساس روش توضیح داده شده توسط Villanueva و همکاران (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. در این روش از P-Nitrophenyl Phosphate به عنوان سوبسترا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شد. فعالیت آنزیمی در طول موج ۶۵۰ نانومتر در مدت ۶ دقیقه خوانده شد (Villanueva et al., 1997). فعالیت لیپاز، پروتئاز و آمیلاز بر اساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت در دقیقه ($U\ mg^{-1}\ Protein\ min^{-1}$) بیان شد و میزان فسفاتاز قلیایی بر اساس میزان آنزیمی که یک ماکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه هیدرولیز می‌کند بیان شد.

جمع‌آوری موکوس و سنجش پارامترهای ایمنی

برای سنجش برخی از پارامترهای ایمنی موکوس از جمله پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز، فسفاتاز قلیایی و همچنین لیزوزیم در پایان دوره آزمایش اقدام به جمع آوری موکوس ماهیان شد. برای انجام این کار ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و داخل کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار (زیپ پلاست) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه به آرامی تکان داده شدند تا تحریک به ترشح موکوس شوند. بعد از این کار موکوس ترشح شده به داخل کیسه‌های پلاستیکی در مجاورت

یخ به لوله‌های فالکون ۲۰ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و ۴ برابر حجم موکوس جمع‌آوری شده به آن فسفات بافر نمکی (PBS) ۱۰ میلی‌مولار (pH ۷/۵، حاوی ۱۱۵ میلی‌مولار میکرو سدیم) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دوره ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. در نهایت فاز بالایی به آرامی جدا و در لوله‌های فالکون تمیز ریخته شد و تا زمان سنجش فاکتورهای ذکر شده در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شد (Hoseinifar et al., 2014).

فعالیت لیزوزیم موکوس بر اساس روش کدورت سنجی و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت (*Micrococcus lysodeikticus*) حساس به آنزیم لیزوزیم مورد سنجش قرار گرفت. در این روش ابتدا مخلوط باکتریایی *Micrococcus lysodeikticus* با اضافه کردن ۰/۲ گرم از سلول‌های لیوفریزه در هر میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی ۰/۰۵ مولار تهیه شد. برای اندازه‌گیری میزان لیزوزیم حدود ۱۰۰µL از سرم به ۲mL از سوسپانسیون باکتریایی از قبل آماده شده اضافه شد و مقدار جذب در طول موج ۴۶۰ نانومتر در زمان‌های ۱۵ ثانیه پس از انجام واکنش و ۵ دقیقه پس از واکنش خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد میزان لیزوزیم (بر حسب U/mL) به دست آمد (Palaksha et al., 2008).

میزان پروتئین کل موکوس با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد. در این روش از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. اندازه‌گیری بر اساس پروتکل پیشنهادی شرکت انجام شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت شد و در نهایت بر اساس ضریب پیشنهادی عدد نهایی پروتئین به دست آمد (Lowry et al., 1951).

میزان فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت تجاری شرکت پارس آزمون بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت مورد سنجش قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد و سپس با استفاده از ضریب مشخص عدد نهایی محاسبه شد (Smith et al., 2000).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم افزارهای Microsoft Excel 2007 و SPSS (نسخه ۱۶) جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از نرمال

بودن آن‌ها، با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تفاوت میانگین تیمارها مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

در طی دوره آزمایش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. به طوری که دمای آب ۲۸/۵±۰/۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۶/۱۲±۱/۰۸ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷/۶±۰/۶ و آمونیاک ۰/۰۰۲۳±۰/۰۰۰۷ میلی‌گرم در لیتر بود.

شاخص‌های رشد و بقا

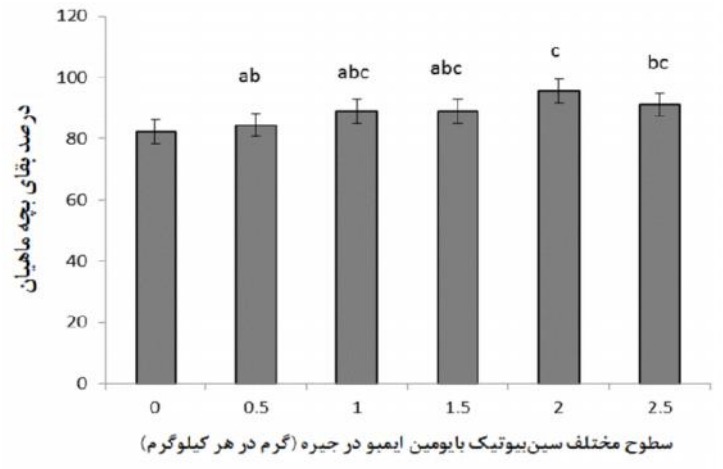
شاخص‌های رشد بچه ماهیان سوروم پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی نشان داد که جیره‌های حاوی سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در هر کیلوگرم جیره به طور موفقیت‌آمیزی باعث بهبود متابولیسم مواد غذایی و در نتیجه افزایش رشد شد. شاخص‌های مختلف رشد بچه ماهیان از جمله وزن نهایی، درصد افزایش وزن (WG%) و شاخص رشد روزانه (SGR) در گروه‌های تغذیه شده با سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در کیلوگرم جیره، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان دادند (P<۰/۰۵). از این بین بالاترین سطح شاخص‌های رشد در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره مشاهده شد (P<۰/۰۵).

بررسی شاخص‌های مرگ و میر و بقاء نشان داد که با افزایش سطوح سین بیوتیک جیره تا ۲ گرم بر کیلوگرم، میزان بقاء افزایش می‌یابد (شکل ۱).

همچنین نتایج آنالیز واریانس نشان داد که سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره به طور معناداری (P<۰/۰۵) باعث بهبود پارامترهای بهره‌وری غذایی شامل ضریب تبدیل غذایی (FCR) و ضریب کارایی پروتئین (PER) شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پایین‌ترین سطح این فاکتورها در گروهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱ و ۱/۵ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره در مقایسه با سایر گروه‌ها دیده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و بهره‌وری غذایی در تیمارها با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

	سطوح مختلف سین بیوتیک بایومین ایمبو در جیره (گرم در هر کیلوگرم)					
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۲/۵
وزن اولیه	۱/۶۵±۰/۰۵^{a}	۱/۶۹±۰/۰۴^{a}	۱/۶۸±۰/۰۵^{a}	۱/۷۰±۰/۰۲^{a}	۱/۷۱±۰/۰۳^{a}	۱/۷±۰/۰۲^{a}
وزن نهایی	۳/۹۳±۰/۱۵^{a}	۳/۹۴±۰/۲۳^{a}	۴/۵۱±۰/۱۵^{bc}	۴/۸۱±۰/۱۸^{c}	۴/۴۴±۰/۰۷^{b}	۴/۰۹±۰/۲۰^{a}
WG(%)	۱۳۷/۶۰±۱۲/۲۱^{a}	۱۳۳/۳۴±۱۲/۲۰^{a}	۱۶۸/۷۸±۹/۸۶^{bc}	۱۸۲/۵۲±۷/۲۶^{c}	۱۵۹/۸۶±۴/۱۵^{b}	۱۴۱/۰۸±۱۴/۰۱^{a}
SGR	۰/۶۲±۰/۰۴^{a}	۰/۶۱±۰/۰۴^{a}	۰/۷۲±۰/۰۳^{cd}	۰/۷۵±۰/۰۲^{d}	۰/۶۹±۰/۰۱^{bc}	۰/۶۶±۰/۰۴^{ab}
FCR	۲/۹۵±۰/۱۶^{c}	۳/۰۱±۰/۱۶^{c}	۲/۶۶±۰/۰۹^{a}	۲/۵۲±۰/۰۶^{a}	۲/۷±۰/۰۴^{ab}	۲/۹۱±۰/۱۸^{bc}
PER	۱/۳۶±۰/۰۷^{c}	۱/۳۸±۰/۰۷^{c}	۱/۲۱±۰/۰۴^{a}	۱/۱۶±۰/۰۲^{a}	۱/۲۴±۰/۰۲^{ab}	۱/۳۴±۰/۰۸^{bc}



شکل ۱: درصد بقای بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

آنزیم‌های گوارشی

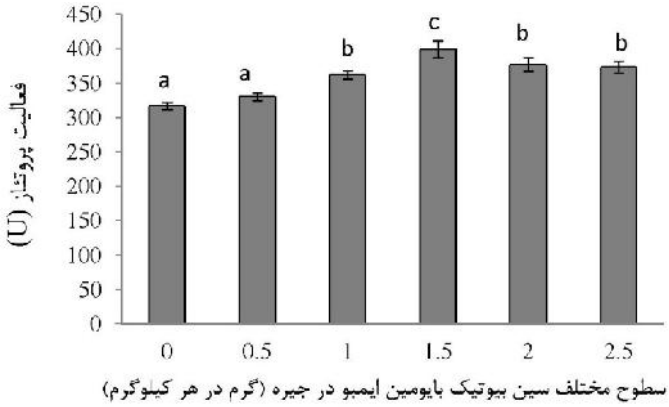
نتایج حاصل از تاثیر سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره بر آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان سوروم در شکل‌های ۲ تا ۵ نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشخص است سطح ۰/۵ گرم

سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره، تاثیر معناداری بر فعالیت اختصاصی پروتئاز نداشته است (P>۰/۰۵)، اما با افزایش میزان سین‌بیوتیک در جیره تا سطح ۱/۵ گرم، فعالیت اختصاصی آنزیم پروتئاز افزایش یافت و بالاترین سطح فعالیت آنزیم در همین گروه مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین فعالیت آنزیم پروتئاز در گروه‌های تغذیه شده با سطوح ۱، ۲ و ۲/۵ گرم سین‌بیوتیک در جیره نسبت به گروه شاهد و گروه تغذیه شده با ۰/۵ گرم سین‌بیوتیک به شکل معناداری در سطح بالاتری قرار داشت (P<۰/۰۵؛ شکل ۲).

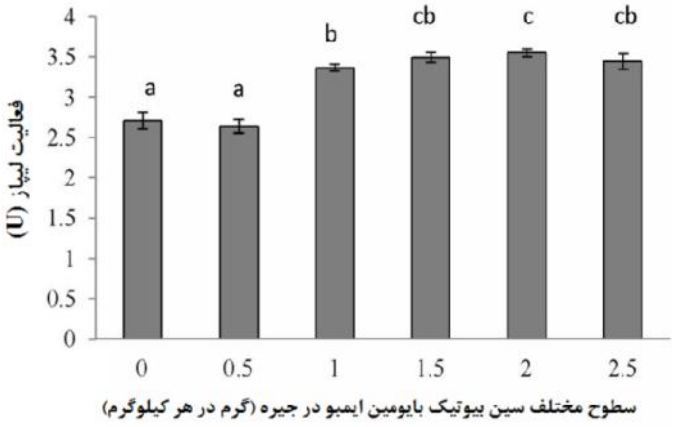
تاثیر سین‌بیوتیک بایومین ایمبو بر فعالیت آنزیم لیپاز دستگاه گوارش معنادار بود (P<۰/۰۵). همان طور که شکل ۳ نشان می‌دهد سطح فعالیت لیپاز دستگاه گوارش در گروه‌های تغذیه شده با سطوح ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره در مقایسه با سایر گروه‌ها به شکل معناداری افزایش یافته بود به طوری که بالاترین سطح آنزیم لیپاز در گروه تغذیه شده با سطح ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو مشاهده شد (P<۰/۰۵).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی دستگاه گوارش در شکل ۴ نشان داد که افزودن سین‌بیوتیک بایومین ایمبو به جیره بچه ماهیان سوروم به شکل معناداری (P<۰/۰۵) باعث افزایش سطح فعالیت این آنزیم در دستگاه گوارش شد. همه گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سین‌بیوتیک بایومین ایمبو به استثناء گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو افرایش معناداری در سطح فعالیت فسفاتاز قلیایی دستگاه گوارش در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵؛ شکل ۵).

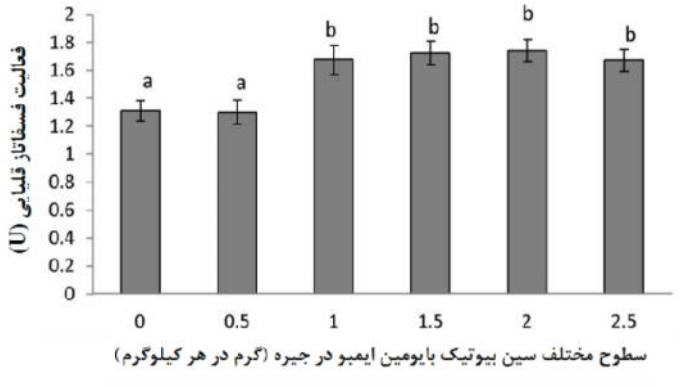
فعالیت آمیلاز دستگاه گوارش بچه ماهیان سوروم یک افزایش وابسته به دز سین‌بیوتیک بایومین ایمبو تا سطح ۲ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلو گرم جیره را نشان دادند به شکلی که بالاترین سطح فعالیت آمیلاز در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ گرم سین‌بیوتیک مشاهده شد. در سایر گروه‌ها نسبت به گروه شاهد و همچنین گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم سین‌بیوتیک افزایش معناداری در سطح فعالیت آمیلاز مشاهده شد (P<۰/۰۵).



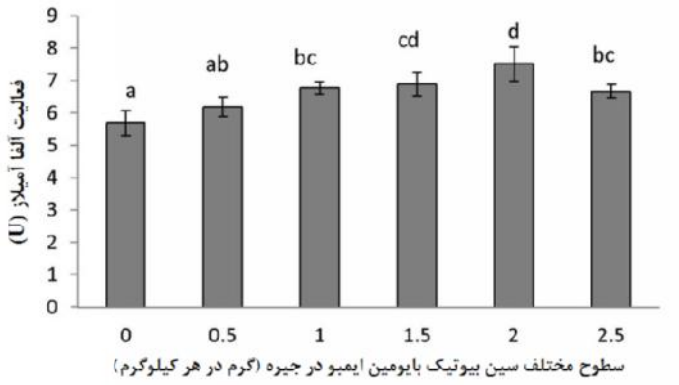
شکل ۲: فعالیت آنزیم پروتئاز دستگاه گوارش بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.



شکل ۳: فعالیت آنزیم لیپاز دستگاه گوارش بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.



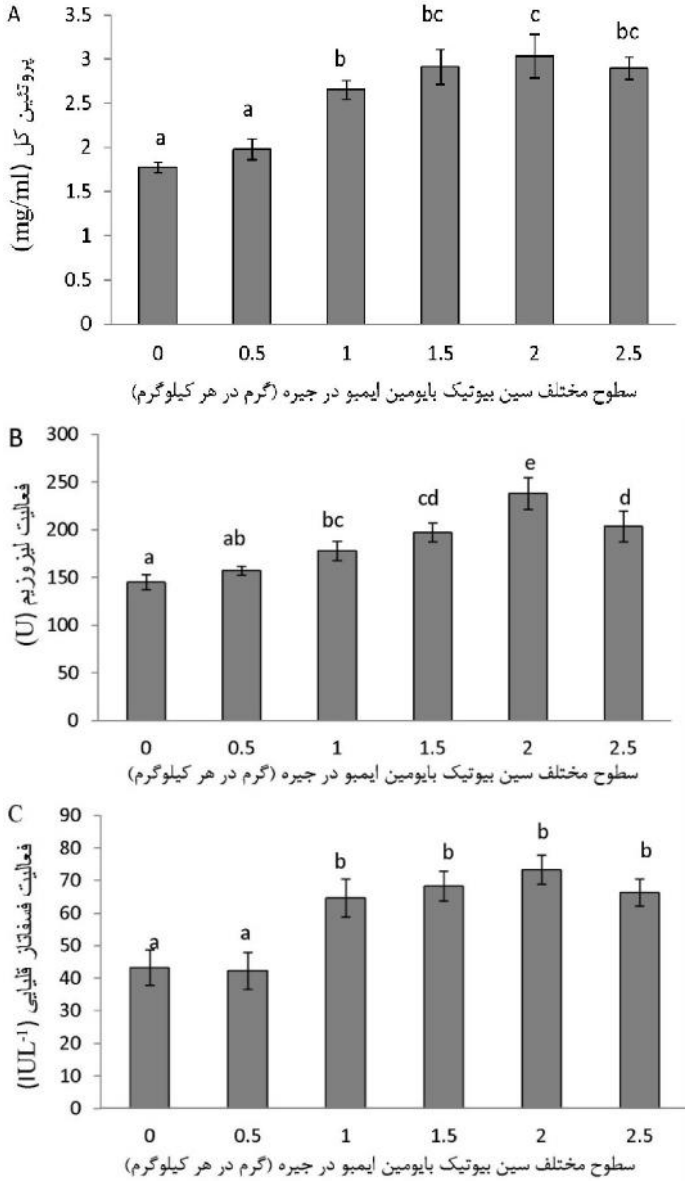
شکل ۴: فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی دستگاه گوارش بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.



شکل ۵: فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دستگاه گوارش بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

پارامترهای ایمنی موکوس

نتایج مربوط به سطوح مختلف پروتئین کل، فسفاتاز قلیایی و همچنین لیزوزیم موکوس پوست در گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶: فعالیت پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی موکوس (A تا C) بچه ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین‌ایمبو در جیره (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در مقایسه با گروه شاهد یک افزایش وابسته به دز سین‌بیوتیک تا سطح ۲ گرم در هر کیلوگرم جیره را نشان دادند و بالاترین سطح پروتئین کل و لیزوزیم موکوس در این گروه مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از تاثیر سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو بر میزان فسفاتاز قلیایی موکوس پوست نشان داد که در همه گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی بایومین ایمبو به استثناء گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم سین‌بیوتیک میزان فسفاتاز قلیایی به شکل معناداری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). با این وجود در بین این گروه‌ها با یکدیگر هیچ گونه تفاوت معناداری دیده نشد (P>۰/۰۵).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱، ۱/۵ و ۲ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در هر کیلوگرم جیره، در مقایسه با گروه شاهد و گروه‌های تغذیه شده با سطوح ۰/۵ و ۲/۵ گرم سین‌بیوتیک بایومین ایمبو، بهبود بهره‌وری غذایی و همچنین افزایش رشد مشاهده شد. در پژوهش مشابهی Mehrabi و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که افزودن سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش رشد را به دنبال داشته است (Mehrabi et al., 2012). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط Yar-Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، نشان دادند که افزودن میزان ۱ گرم سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو به جیره به طور معناداری باعث بهبود بهره‌وری غذایی و افرایش رشد در بچه ماهیان کپور معمولی (*cyprinus carpio*) شده است. همچنین بشکار دانا و همکاران (۱۳۹۳) در ماهی طلایی نژاد اوراندا و طالبی حقیقی و همکاران (۱۳۸۹) در بچه ماهیان ماهی سفید دریای خزر در مورد اثر سین‌بیوتیک بایومین ایمبو بر پارامترهای رشد و بهره‌وری غذایی نتایج مشابهی را گزارش کردند. مکمل‌های غذایی پروبیوتیکی و پری‌بیوتیکی از طریق مکانیسم‌های مختلفی باعث بهبود بهره‌وری غذایی و متعاقب آن افزایش رشد در ماهیان می‌شوند. یکی از مکانیسم‌های محتمل به این نکته برمی‌گردد که پری‌بیوتیک‌ها و پروبوتیک‌ها باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش میزبان به سمت باکتری‌های تخمیر کننده می‌شوند (Gibson

(et al., 2004; Akrami et al., 2013). برخی از این باکتری‌های پروبیوتیکی می‌توانند باعث افزایش فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش شوند یا از طریق افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی میزبان باعث افزایش ترشح آنزیم توسط خود این باکتری‌ها شوند، که این باعث بهبود فرآیند هضم و جذب مواد غذایی و در نتیجه افزایش رشد می‌شود (Sako et al., 1999; Pandiyan et al., 2013). احتمال دیگر این است که پروبیوتیک‌های موجود در سین‌بیوتیک مورد آزمایش، طی فرآیند تخمیر متابولیت‌هایی مانند برخی از انواع ویتامین‌ها، استات و لاکتات تولید می‌کنند که این مواد از طریق جریان خون به کبد انتقال می‌یابند و با مصرف شدن به عنوان مواد غذایی توسط میزبان باعث بهبود رشد می‌شوند. در این راستا مطالعه‌ای که بر روی استفاده از پروبیوتیک *Entrococcus faecium* ZJ4 انجام گرفت، مشخص شد که استفاده از این گونه باکتریایی در جیره غذایی ماهی تیلاپیا باعث افزایش رشد شده است (Wang et al., 2008). در کل تایید شده است که ترکیبات سین‌بیوتیکی باعث تغییر و بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی می‌شوند که این فلور میکروبی از طریق مکانیسم‌های مختلفی باعث بهبود فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش ماهی می‌شود که در نتیجه بهبود عمل هضم و جذب را به دنبال دارد و نهایتاً باعث افزایش رشد می‌شود.

علاوه بر جزء پروبیوتکی، جزء دیگر سین‌بیوتیک بایومین ایمبو پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید است. فروکتوالیگوساکارید یک ترکیب غیرقابل هضم ولی قابل تخمیر است که با تاثیرات مختلفی که بر دستگاه گوارش میزبان به جای می‌گذارد باعث افزایش رشد می‌شود. مطالعات گذشته به خوبی نشان داده‌اند که استفاده از فروکتوالیگوساکارید باعث بهبود ساختار مورفولوژیکی و هیستولوژیکی دستگاه گوارش از جمله افزایش طول و تعداد میکروویلی‌ها و همچنین افزایش تعداد سلول‌های جامی می‌شود که این باعث جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش و در نتیجه بهبود رشد موجود میزبان می‌شود (Dimitroglou et al., 2010). همچنین پری‌بیوتیک‌ها از جمله فروکتوالیگوساکارید به عنوان منبع غذایی برای باکتری‌های تخمیر کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند که هم باعث افزایش جمعیت این باکتری‌ها از جمله بیفیدیوباکترها می‌شوند و هم در نتیجه تخمیر به متابولیت‌هایی مثل اسید لاکتیک، استات،

لاکتات و پروپیونات تبدیل می‌شوند که می‌توانند به عنوان منابع انرژی برای میزبان باشند (Sako et al., 1999; Dimitroglou et al., 2010).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن سین‌بیوتیک بایومین ایمبو به جیره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی از جمله لیپاز، پروتئاز، آمیلاز و فسفاتاز قلیایی شد. در همین راستا مطالعات قبلی نشان داده‌اند که استفاده از ترکیبات پری‌بیوتیک و پروبیوتیک مختلف باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی گونه‌های مختلف می‌شود. به عنوان مثال اضافه کردن *Bacillus* sp. در جیره غذایی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*؛ Yanbo and Zirong, 2006)، اضافه کردن پروبیوتیک *Lactobacillus* spp. در جیره غذایی لارو گونه بس دریایی (*Sparus aurata*, L.؛ Yanbo and Zirong, 2006) و همچنین اضافه کردن سویه‌های مختلف پروبیوتیکی در جیره غذایی گونه‌های مختلف میگو (Wang, 2007; Zhou et al., 2009) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی میزبان خود می‌شوند. همچنین در ارتباط با پری‌بیوتیک‌ها مشخص شده است که اضافه کردن فروکتوالیگوساکارید در جیره ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*؛ Soleimani et al., 2012) و همچنین پری‌بیوتیک گزیلوالیگوساکارید در جیره ماهی حوض (*Carassius auratus gibelio*؛ Xu et al., 2009) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شده است. در مورد اثر ترکیبات سین‌بیوتیکی بر آنزیم‌های گوارشی نیز در مطالعه‌ای که بر روی اثر فروکتوالیگوساکارید، مانان‌الیگوساکارید و باکتری *Bacillus clausii* انجام شد مشخص شد که افزودن هر سه مکمل غذایی به جیره به عنوان سین‌بیوتیک اثر بیش‌تری بر بهبود آنزیم‌های گوارشی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) داشته است (Ye et al., 2011). سین‌بیوتیک بایومین ایمبو احتمالاً از طریق دو مکانیسم باعث افزایش سطح آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان سوروم می‌شود، یکی تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی میزبان و مکانیسم دیگر از طریق افزایش سطح آنزیم‌های گوارشی خارجی که توسط فلور میکروبی دستگاه گوارش، که احتمالاً با افزودن سین‌بیوتیک بایومین ایمبو به جیره غذایی بهبود یافته‌اند، ترشح می‌شوند (Soleimani et al., 2012). نتیجه‌ای که به دنبال افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی حاصل می‌شود، بهبود هضم

و جذب مواد غذایی و در نتیجه کاهش چشم‌گیر در میزان ضریب تبدیل غذایی است.

موکوس پوست ماهیان به عنوان اولین سد دفاعی بدن است که می‌تواند علیه محدوده وسیعی از عوامل بیماری‌زا مثل باکتری‌ها، انگل‌های تک‌یاخته‌ای و پریاخته‌ای، قارچ‌ها و همچنین برخی از ویروس‌ها عمل کند (Palaksha et al., 2008). نتایج حاصل از مطالعه اخیر نشان داد که استفاده از سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره بچه ماهیان سوروم به شکل معناداری باعث افزایش سطح فعالیت فاکتورهای ایمنی موکوس مثل میزان پروتئین کل، لیزوزیم و فسفاتاز قلیایی، شده است. لیزوزیم یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ایمنی در بدن آبزیان است که می‌تواند هم علیه باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی عمل کند و همچنین از دیگر فعالیت‌های آن در بدن می‌توان به فعال‌سازی سیستم کمپلمان اشاره کرد (Saurabh and Sahoo, 2008). پروتئین کل موکوس نیز یکی دیگر از پارامترهای ایمنی به شمار می‌آید که دربرگیرنده مواد پروتئنی دیگر از جمله آلبومین و گلوبولین است که می‌توانند فعالیت ضدباکتریایی داشته باشند. از طرف دیگر فسفاتاز قلیایی هم به عنوان یکی از پارامترهای ایمنی موکوس شناخته شده است که به دلیل داشتن خاصیت هیدرولیتیک می‌تواند فعالیت ضدباکتریایی داشته باشد (Iger and Abraham, 1990; Palaksha et al., 2008). هم راستا با نتایج حاصل از این مطالعه، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های غذایی در جیره غذایی باعث بهبود پارامترهای ایمنی موکوس می‌شود. به عنوان مثال مشخص شده است که استفاده از ویتامین C در جیره غذایی بچه ماهیان کلمه باعث افزایش سطح پروتئین کل و فسفاتاز قلیایی موکوس شده‌اند (Roosta et al., 2014). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که اضافه کردن پری‌بیوتیک گزیلوالیگوساکارید باعث افزایش سطح پروتئین کل و فعالیت ضدباکتریایی موکوس بچه ماهیان ماهی سفید شده است (Hoseinifar et al., 2014). اگرچه مکانیسم اثر مکمل‌های غذایی پری‌بیوتیکی و پروبیوتیکی بر پارامترهای ایمنی موکوس در ماهیان به خوبی مشخص نشده است ولی دلیل این افزایش فعالیت ایمنی می‌تواند در ارتباط با افزایش ترشح موکوس باشد. همچنین به این نکته اشاره شده است که ترکیباتی که باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش می‌شوند از جمله

پری‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها می‌توانند از طریق بهبود فعالیت بافت‌های لمفوییدی در ارتباط با دستگاه گوارش بهبود کلی سیستم ایمنی گونه میزبان را به دنبال داشته باشند (Nayak 2010a,b; Kiron, 2012).

در اغلب مطالعاتی که بر روی اثر پری‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی ماهیان مثل رشد، بهره‌وری غذایی و یا ایمنی و متابولیسم انجام شده است، مشخص شده که افزودن سطوح مختلف نتایج متفاوتی خواهد داشت و یکی از جنبه‌های پراهمیت این دسته مطالعات می‌تواند همین پیدا کردن غلظت مناسب از مکمل غذایی برای یک گونه خاص باشد. در مطالعه‌ای که توسط Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۴) و Cerezuela و همکاران (۲۰۱۲) بر روی پروبیوتیک‌ها انجام شد، این موضوع تایید شده است. همچنین مطالعه‌ای دیگری که توسط Nekoubin و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد نیز نشان داد که سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو تاثیرات مختلفی بر پارامترهای رشد ماهی آنجل داشته است به طوری که بهترین نتایج در گروه تغذیه شده با غلظت ۰/۷۵ گرم در کیلوگرم به دست آمده بود، ولی با افزایش میزان غلظت سین‌بیوتیک از ۰/۷۵ به ۱ گرم در کیلوگرم تاثیر مثبت آن کاهش یافت.

به طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه بهبود بهره‌وری غذایی و افزایش پارامترهای رشد در بچه ماهیان سوروم می‌شود. همچنین نتایج به خوبی نشان داد که استفاده از سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره غذایی بچه ماهیان سوروم باعث تقویت پارامترهای ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست، به عنوان اولین خط دفاع غیراختصاصی، می‌شود که در بچه ماهیان دارای اهمیت به سزایی است.

منابع

بشکار دانا س.، مقدسی ب. و منوچهری ح. ۱۳۹۳. تأثیر استفاده از سین‌بیوتیک بایومین ایمبو در جیره غذایی بر کارایی رشد بچه ماهیان طلایی نژاد اوراندا (*Carassius auratus*). فصلنامه زیست‌شناسی جانوری، ۷(۲): ۱۲-۱.

پورداوود م.، سجادی م.م. و بحری ا.ه. ۱۳۸۹. بررسی اثرات جیره‌های غذایی حاوی مخمر ساکارومایسیس سرویزیا بر رشد، زنده‌مانی و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی ماهی سوروم (*Heros severus*). مجله علمی آبزیان و شیلات، ۱(۱): ۳۱-۲۳.

طالبی حقیقی د.، فلاحی کپورچالی م. و عبدالله تبار س.ی. ۱۳۸۹. اثرات سطوح مختلف سین‌بیوتیک Biomin Imbo بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان سفید. مجله شیلات، ۴(۳): ۱۴-۱.

مازندرانی م.ص. ۱۳۹۱. اثر مکمل غذایی سین بیوتیک (بایومین ایمبو) بر شاخص رشد، بازماندگی و مقاومت در برابر برخی از عوامل محیطی (دما و شوری) در بچه ماهی کپور وحشی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر. ۶۵ص.

Ai Q., Xu H., Mai K., Xu W., Wang J. and Zhang W. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317: 155–161.

Akrami R., Iri Y., Rostami H.K. and Mansour M.R. 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, *Lactobacillus* bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. Fish and shellfish immunology, 35: 1235–1239.

Balcazar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. and Muzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114: 173–186.

Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β. Methods in Enzymology, 1: 149–158.

Cerezuela R., Meseguer J. and Esteban M. 2012. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A review. Journal of Aquaculture Research and Development, 3: 1–7 (86390726).

Chang C.I. and Liu W.Y. 2002. An evaluation of two probiotic

bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Diseases, 25: 311–315.

Dimitroglou A., Merrifield D.L., Spring P., Sweetman J., Moate R. and Davies S.J. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 300: 182–188.

Ellis A. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25: 827–839.

Gatesoupe F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180: 147–165.

Geraylou Z., Souffreau C., Rurangwa E., De Meester L., Courtin C.M., Delcour J.A., Buyse J. and Ollevier F. 2013. Effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotics on the growth performance, non-specific immunity and gut microbiota of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Fish and Shellfish Immunology, 35: 766–775.

Ghehdarijani M.S., Hajimoradloo A., Ghorbani R. and Roohi Z. 2015. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish and Shellfish Immunology, 49: 79–83.

Gibson G.R., Probert H.M., Loo J.V., Rastall R.A. and Roberfroid M.B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Review, 17: 259–275.

Hidalgo M., Urea E. and Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture, 170: 267–283.

Hoseinifar S.H., M. Sharifian, M.J. Vesaghi, M. Khalili and M.A. Esteban 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish and Shellfish Immunology, 39: 231–236.

Hoseinifar S.H., Roosta Z., Hajimoradloo A. and Vakili F. 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance

of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish and Shellfish Immunology, 42: 533–538.

Iger Y. and Abraham M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology, 36: 421–437.

Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. Animal Feed Science and Technology, 173: 111–133.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological chemistry, 193: 265–275.

Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20: 137–151.

Mehrabi Z., Firouzbakhsh F. and Jafarpour A. 2012. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96: 474–481.

Nayak SK. 2010a. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, 29: 2–14.

Nayak S.K. 2010b. Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41: 1553–1573.

Nekoubin H., Hatefi S., Javahery S. and Sudagar M. 2012. Effects of synbiotic (Biomin Imbo) on growth performance, survival rate, reproductive parameters of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Walailak Journal of Science and Technology, 9(4): 327–332.

Palaksha K., Shin G.W., Kim Y.R. and Jung T.S. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 24: 479–488.

Pandiyan P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E.G.J., Subaramaniyan K., Manikkam S. and Sadayappan B. 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today, 5: 55–59.

Roosta Z., Hajimoradloo A., Ghorbani R. and Hoseinifar S.H. 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. Fish Physiology and Biochemistry, 40: 1601–1607.

Sako T., Matsumoto K. and Tanaka R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-

oligosaccharides. International Dairy Journal, 9: 69–80.

Saurabh S. and Sahoo P. 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39: 223–239.

Smith D.R., Padilla W.J., Vier D., Nemat-Nasser S.C. and Schultz S. 2000. Composite medium with simultaneously negative permeability and permittivity. Physical Review Letters, 84: 41–84.

Soleimani N., Hoseinifar S.H., Merrifield D.L., Barati M. and Abadi Z.H. 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.

Subharanjani S., Gunarani R., Prema P. and Immanuel G. 2015. Potential influence of probiotic bacteria on the growth gut microflora of *Carassius auratus*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 2: 319–323.

Subramanian S., MacKinnon S.L. and Ross N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148: 256–263.

Tinh N.T.N., Dierckens K., Sorgeloos P. and Bossier P. 2008. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Marine Biotechnology, 10: 1–12.

Venkat H. K., Sahu N.P. and Jain K.K. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research, 35(5): 501–507.

Villanueva J., Vanacore R., Goicoechea O. and Amthauer R. 1997. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: Regional distribution and membrane association. Journal of Experimental Zoology, 279: 347–355.

Wang Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269: 259–264.

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

Worthington C.C. 1988. Worthington enzyme manual: Enzymes and related biochemicals. Freehold, NJ: Worthington Biochemical Corporation. 346P.

Wu Y., Liu W.B., Li H.Y., Xu W.N., He J.X., Li X.F. and Jiang G.Z. 2013. Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. Aquaculture Nutrition, 19: 886–894.

Xu B., Wang Y., Li J. and Lin Q. 2009. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish Physiology and Biochemistry, 35: 351–357.

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.

Yar-Ahmadi P., Moradi N. and Ghysvandi N. 2014. The effect of dietary supplemented with Synbiotic (Biomin IMBO®) on growth performance, carcass composition, hematological and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, Cyprinidae). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4: 21–29.

Ye J. D., Wang K., Li F.D. and 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.

Zhang Q., Yu H., Tong T., Tong W., Dong L., Xu M. and Wang Z. 2014. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide enhance the growth, non-specific immunity of juvenile ovate pompano, *Trachinotus ovatus* and its disease resistance against *Vibrio vulnificus*. Fish and Shellfish Immunology, 38: 7–14.

Zhou X., Wang Y. and Li W. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture, 287: 349–353.

Aquatic Physiologyand Biotechnology
Vol. 3, No. 1, Spring 2015

Effect of synbiotic Biomin Imbo on growth parameters, survival, digestive enzymes and mucus parameters of banded cichlide (*Heros severus*)

Pegah Gheshlaghi[1], Ghasem Rashidian[2], Elaheh Chardeh Baladehi[3], Tahere Bagheri[4]*, Hamed Ghafari Farsani[5]

Received: April 2015 Accepted: June 2015

Abstract

This study investigated the effects of different levels of synbiotic Biomin Imbo in the diet on growth performance, food efficiency, survival, digestive enzymes activity and some mucus immunological indices of banded cichlide. The experiment designed using a completely randomized test in a control (0 g synbiotic) and 5 treatments, including 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 g/Kg synbiotic diet, any group with 3 replicates and 15 fish per treatment for 60 days. The results of this study showed that the addition of 0.5 g/Kg synbiotic in diet hadn't significant effect on growth parameters and feed efficiency ($P>0.05$). However, higher levels of Biomin Imbo synbiotic on diets significantly increased growth parameters such as final weight, percent of body weight, daily growth rate (SGR) and feed efficiency parameters such as feed conversion ratio (FCR) and protein efficiency ratio (PER) ($P<0.05$). Fish fed dietary with synbiotic showed significant changes in non-specific skin mucus immune parameters, including lysozyme, total protein and alkaline phosphatase ($P<0.05$). Eventually results of this study showed that synbiotic Biomin Imbo have the beneficial effects on metabolism and growth of banded cichlide, also it increases the safety of juveniles and increase the survival of this fishes.

Key words: *Mucus, Immunology, Resistant, Synbiotic, Ornamental Fish, Supplement.*

1- M.Sc. of Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University of Tehran Research, Tehran, Iran.
2- M.Sc. of Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Tehran University, Karaj, Karaj, Iran.
3- M.Sc. Student of Aquatic Ecology, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Ph.D. of Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
5- Ph.D. Student, Young Researchers and Elites, Islamic Azad University, ShahreKord Branch, ShahreKord, Iran.
*Corresponding Author: bagheri1360@gmail.com