University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 1, 2020, pages: 71-83

Effects of dietary specific probiotics on some growth and immunity indices, hepatic enzymes and intestinal bacterial flora of reared Persian sturgeon *Acipenser persicus* fingerlings

Rezvanollah Kazemi[1*], Mahtab Yarmohammadi[1], Alireza Shenaver Masouleh[1], Ali Hallajian[1], Babak Tizkar[2], Hooshang Yeganeh[1], Jalil Jalilpour[1], Mehdi Alizadeh[1]

1- International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Guilan, Iran
2- Aquaculture Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Guilan, Iran.

Received 03 October 2019 Accepted 30 January 2020

KEYWORDS

Persian sturgeon

Probiotic

Growth

Immunity

Liver enzymes

Bacterial flora

ABSTRACT

This study was carried out to increase production efficiency of Persian sturgeon *Acipenser persicus* fingerlings. In this experiment, 600 pieces of Persian sturgeon fingerlings (10.76 ± 0.74 g in weight and 14.49 ± 0.7 cm in total length) in four treatments were introduced into twelve fiberglass tanks with 300-L water capacity for 60 days. The treatments were fed with diets containing 0, 150, 300 and 450 mg of four bacterial strains including *Lactococcus lactis, Pediococcus pentosaceus, Weissella cibaria* and *Enterococcus faecalis* powder per kg pelleted diets to make certain concentrations including 0 (T_1), 1.5×10^9 (T_2), 3×10^9 (T_3) and 4.5×10^9 CFU/g (T_4). The results showed that there was no significant difference in growth indices in different treatments ($p>0.05$). However, the maximum and minimum mean final weights were observed in T_2 and T_1, respectively. The minimum and maximum values of liver enzymatic indices, LDH, IgM, lysozyme activity and the number of colonial intestine bacterial flora were observed in T_2 and T_1, respectively, significantly different from the other treatments ($p<0.05$). The maximum and minimum number of intestinal lactic acid (probiotic) bacteria were also found in T_2 and T_4, respectively, significantly different from the others ($p<0.05$). In spite of the fact that a probiotic-supplemented diet could not exhibit a significant effect on growth indices of the Persian sturgeon fingerlings at the weight range of 10-60 g, however, those containing 1.5×10^9 CFU/g (T_2), significantly enhanced the immunity, enzymatic and bacterial flora of the intestine.

*Corresponding author: rezkazemi2000@yahoo.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال ششم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹، صفحات ۸۳-۷۱

"مقاله پژوهشی"

تأثیر جیره غذایی حاوی پروبیوتیک اختصاصی بر برخی از شاخص‌های رشد، ایمنی، آنزیم‌های کبدی و فلور باکتریایی روده بچه‌تاسماهی پرورشی ایرانی *Acipenser persicus*

رضوان‌اله کاظمی*[1]، مهتاب یارمحمدی[1]، علیرضا شناور ماسوله[1]، علی حلاجیان[1]، بابک تیزکار[2]، هوشنگ یگانه راسته‌کناری[1]، جلیل جلیل‌پور[1]، مهدی علیزاده[1]

۱- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، گیلان، ایران

۲- گروه آبزی‌پروری، مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، گیلان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۰

چکیده

این مطالعه به منظور افزایش راندمان تولید بچه تاسماهی ایرانی در راستای برنامه‌های بازسازی ذخایر و توسعه پرورش آنها در کشور انجام شد. برای انجام این آزمایش، ۶۰۰ قطعه بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در قالب چهار تیمار (با سه تکرار) به ترتیب (۰/۷۴ ± ۱۰/۷۶ گرم و ۰/۷۰ ± ۱۴/۴۹ سانتی‌متر) به ۱۲ مخزن فایبرگلاس با حجم ۳۰۰ لیتر معرفی شدند. بچه‌ماهیان به مدت ۶۰ روز پرورش یافتند. غذای بچه‌ماهیان با ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم از پودر حاوی ۴ سویه باکتری *Lactococcus lactis*، *Pediococcus pentosaceus*، *Weissella cibaria* و *Enterococcus faecalis* برای ساخت غلظت‌های مشخص $۱/۵ \times ۱۰^{۹}$ (تیمار ۲)، ۳×۱۰^{۹} (تیمار ۳) و $۴/۵ \times ۱۰^{۹}$ پرگنه باکتری در گرم (تیمار ۴) به ازای هر کیلوگرم غذا تهیه شد. جیره گروه شاهد (تیمار ۱) نیز بدون باکتری‌های پروبیوتیک بود. نتایج نشان داد که در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های رشد وجود نداشت (p>۰/۰۵). با وجود این، بیشینه و کمینه میانگین وزن نهایی به ترتیب در ماهیان جوان تیمارهای ۲ و ۱ مشاهده شد. نتایج شاخص‌های آنزیمی کبد و LDH، ایمونوگلوبولین M، فعالیت لیزوزیم و فلور باکتریایی روده نشان داد که کمینه و بیشینه مقدار این شاخص‌ها با اختلاف معنی‌دار به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۱ مشاهده شدند (p<۰/۰۵). بیشینه تعداد باکتری‌های پروبیوتیک روده در تیمار ۲ و کمینه آن در تیمار ۴ با اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) رخ داد. اگرچه جیره دارای پروبیوتیک نتوانست در بچه تاسماهی ایرانی در بازه وزنی ۶۰-۱۰ گرم در شاخص‌های رشد تأثیر معنی‌دار ایجاد کند، اما جیره حاوی پروبیوتیک با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۹}$ کلنی باکتری در گرم (تیمار ۲) به طور معنی‌دار سبب بهبود شاخص‌های ایمنی، آنزیمی و فلور باکتریایی روده شد.

کلمات کلیدی

تاسماهی ایرانی

پروبیوتیک

رشد

ایمنی

آنزیم‌های کبدی

فلور باکتریایی

نویسنده مسئول: Rezkazemi2000@yahoo.com

مقدمه

دگرگونی ترکیبات میکروبی زنده و در پی آن کاهش پشتیبانی از فلور میکروبی روده ماهیان ممکن است باعث افزایش بیماری و کاهش رشد شود که با انتخاب سویه‌های سودمند و کنترل تعداد این میکروب‌های سودمند زنده و کاهش سویه‌های منفی می‌توان به بازده غذایی مناسب، رشد ماهی و سلامت آنها دست یافت (عسگری‌فر و همکاران، ۱۳۹۴). در واقع، در بخش‌های مختلف آبزی‌پروری می‌توان بهبود و افزایش سرعت رشد، کیفیت سلامت و کاهش تلفات ماهیـان به خصوص در مراحـل اولـیه زنـدگی (لاروی و بچه‌ماهی) را از طریق بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش با افزودن مکمل‌های غذایی چون پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها انجام داد (قشلاقی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Subharanjani, et al. 2015). یک پروبیوتیک برای داشتن بیشینه تأثیر و فعالیت مطلوب برای سلامتی و رشد بهینه ماهی، باید گونه، سویه و غلظت آن در جیره غذایی مناسب و فاقد اثر سمی و مسمومیت باشد (Soltani et al. 2015). پروبیوتیک‌ها از یک طرف مکمل‌های غذایی غیر قابل جذبی هستند که با تعدیل دستگاه مخاطی ایمنی عمومی و بهبود تعادل میکروفلور روده سبب جلوگیری از استقرار باکتری‌های غیر مطلوب در روده می‌شوند و از طرف دیگر، با افزایش نسبت جذب غذا اثرات مثبت رشد را در موجود زنده نمایان می‌کنند (Zare et al. 2015). همچنین، پروبیوتیک‌ها فواید تغذیه‌ای داشته، سبب تقویت موکوس دیواره روده می‌شوند (Martinez Cruz et al. 2012). این موارد ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر آبزیان تأثیر بگذارند (هاشمی مفرد و همکاران، ۱۳۹۵). در حالت نخست، با تغییر در تعادل میکروبی روده جاندار و فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش آبزی سبب ایجاد مقاومت در برابر بیماری شده و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد مغذی سبب افزایش رشد شوند. در حالت دوم نیز با بهبود کیفیت آب و محیط زندگی آبزی، استرس کاهش یافته، احتمال بروز بیماری به حداقل خواهد رسید (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳). در واقع، استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان یکی از روش‌های مهم در فناوری‌های نوین تغذیه (Hai, 2015) و رشد اقتصادی آبزیان (خالقی و همکاران، ۱۳۹۷) در آبزی‌پروری محسوب می‌شود.

بهترین روش کاهش هزینه‌های تغذیه آبزیان، استفاده از پروبیوتیک در غذای آنهاست (Delsoz et al. 2017)، زیرا پروبیوتیک‌ها با به تعادل رساندن فلورمیکروبی روده، موجب بهبود جذب مواد غذایی، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و کاهش مشکلات بیماری می‌شوند که به دنبال خود، افزایش رشد و بازماندگی را به همراه خواهد داشت (Yanbo and Zirong, 2006). مطالعاتی در خصوص تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری به منظور بهبود شاخص‌های رشد و بازماندگی در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (جعفریان و همکاران، ۱۳۸۶؛ Faramarzi et al. 2011؛ Iranshahi et al. 2011؛ Salaghi et al. 2013)، شاخص‌های خونی، بیوشیمیـایی، ایمنی و رشد فیل‌ماهی (*Huso huso*) (بینایی و همکاران، ۱۳۹۰؛ قربانی و همکاران، ۱۳۹۹؛ یگانه و همکاران، ۱۳۹۹؛ Askarian et al. 2011)، فلور باکتریایی روده تاسماهی ایرانی (شناور ماسـوله، ۱۳۹۱؛ شناور ماسـوله و همکاران، ۱۳۹۵)، شاخص‌های رشد و ایمنی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (مصلحی و همکاران، ۱۳۹۳؛ هاشمی فرد و همکاران، ۱۳۹۵) و شاخص‌های خونی و ایمنی بچه‌تاسماهی ایرانی (علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶؛ Agh et al. 2009) انجام شده است.

تاسماهی ایرانی از خانواده ماهیان خاویاری یکی از پنج گونه مهم و تجاری دریای خزر است که امروزه بیشترین جمعیت تاسماهیان حوضه جنوبی دریای خزر را تشکیل می‌دهد (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۵). این گونه بومی آب‌های ایرانی جنوب دریای خزر، پس از ۲۵۰ میلیون سال زیست در نیمکره شمالی به سبب صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه طبیعی، کاهش کیفیت آب (آلودگی‌ها)، صید قاچاق و ساخت سد روی رودخانه‌ها (Carmona et al. 2009; Kazemi et al. 2020) در معرض خطر قرار دارد.

با توجه به کاهش روزافزون تاسماهیان ایرانی مولد در دریای خزر، حفظ و ارتقای کمی و کیفی بچه‌ماهیان به منظور بهره‌برداری در امر بازسازی ذخایر دریای خزر و همچنین، پرورش گونه مورد نظر، این مطالعه بر پایه باکتری‌های گروه اسید لاکتیک استخراج شده از روده تاسماهی ایرانی و با هدف

تعیین مقادیر مناسب و مؤثر این پروبیوتیک‌های اختصاصی برای بهبودی رشد و سلامت بچه‌تاسماهی ایرانی انجام شد.

مواد و روش ها

مکان و زمان آزمایش

این مطالعه در بخش‌های آبزی‌پروری، فیزیولوژی و بیوشیمی و بهداشت و بیماری‌های مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر واقع در ۲۵ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان رشت، استان گیلان انجام شد. بچه‌تاسماهی ایرانی مورد نیاز (۶۰۰ قطعه) از تکثیر یک جفت تاسماهی ایرانی وحشی نر و ماده (به ترتیب با وزن و درازای کل ۱۸ و ۱۲ کیلوگرم و ۱۵۴ و ۱۳۹ سانتی‌متر) تهیه شد. این مطالعه با سه تیمار غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی و یک گروه شاهد (بدون پروبیوتیک) و با سه تکرار برای هر تیمار از تیر ماه ۱۳۹۷ با معرفی ۵۰ قطعه بچه‌تاسماهی ایرانی به ترتیب با میانگین وزن و درازای کل (۰/۷۴ ± ۱۰/۷۶ گرم و ۰/۷۰ ± ۱۴/۴۹ سانتی‌متر) به هر مخزن فایبرگلاس (هر تکرار) ۵۰۰ لیتری با حجم مفید آب ۳۰۰ لیتر (۱/۷۶ کیلوگرم در مترمکعب یا ۱۶۷ قطعه در متر مکعب) آغاز شد. حجم آب ورودی در هر مخزن ۳ لیتر در دقیقه بود. برای هوادهی پیوسته در هر مخزن از پمپ هواساز و یک عدد سنگ هوا استفاده شد.

تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی شامل غذای حاوی پروبیوتیک‌های اختصاصی جدا شده از روده تاسماهی ایرانی (شناور ماسوله، ۱۳۹۱) و تیمار شاهد (غذای فاقد پروبیوتیک) به ازای هر کیلوگرم غذا بود. برای تهیه جیره آزمایشی، پودر پروبیوتیک‌های مورد استفاده به میزان تعیین شده، در زیر هود لامینار در ظروف پلاستیکی سترون توزین و در ۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک حل و هر غلظت به یک کیلوگرم غذای پلت فرموله (کوپنز با شماره ۰۲۶۵۳۰ به قطر ۱/۵ و ۲ میلی‌متر) (جدول ۱) افشانه شد. قبل از آغاز آزمایش، بچه‌ماهیان با میانگین وزن ۰/۱۳± ۵/۱۷ گرم به مدت ۲۰ روز در مخازن فایبرگلاس دو تنی با غذای کنسانتره کوپنز سازگار شدند. در دوره سازگاری هیچ یک از بچه‌ماهیان دچار مرگ و میر نشد.

بچه‌تاسماهیان ایرانی با میانگین وزن ۰/۷۴± ۱۰/۷۶ گرم به مدت ۹ هفته با غذای حاوی پروبیوتیک‌های اختصاصی *Lactococcus lactis*، *Pediococcus pentosaceus*، *Weissella cibaria* و *Enterococcus faecalis* (در سه تیمار ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا و تیمار شاهد بدون پروبیوتیک) پرورش یافتند. تراکم باکتری‌ها در سه ۳ سطح ۱۵۰ میلی‌گرم یا $۱۰^{۹}$ × ۱/۵ باکتری در گرم (CFU/g) (تیمار ۲)، ۳۰۰ میلی‌گرم یا $۱۰^{۹}$ × ۳ باکتری در گرم (تیمار ۳) و ۴۵۰ میلی‌گرم یا $۱۰^{۹}$ × ۴/۵ باکتری در گرم (تیمار ۴) به ازای هر کیلوگرم غذا در مقایسه با گروه شاهد (تیمار ۱ یا گروه فاقد پروبیوتیک) بود.

در دوره ۶۰ روزه پرورش، هر مخزن روزانه سه بار (ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴) به میزان ۵/۵٪ در ۱۵ روز اول و ٪ وزن بدن تا پایان آزمایش، غذادهی شدند. برای تجزیه و تحلیل شاخص‌های رشد، زیست‌سنجی ماهیان در پایان روزهای ۳۰ (ماه اول) و ۶۰ (ماه دوم) پرورش انجام شد. روزانه اندازه‌گیری دما، اکسیژن محلول، درصد اشباعیت اکسیژن محلول و پی‌اچ مخازن آزمایشی با اکسیژن متر- دماسنج دیجیتال (مدل HQ40d مولتی شرکت HACH آلمان) و پی‌اچ متر (مدل 2A20-1012 -PH i/set۳۳۰ شرکت WTW آلمان) انجام شد.

تهیه باکتری‌های اسید لاکتیک

باکتری‌های اسید لاکتیک تیمارهای مختلف این مطالعه از باکتری‌های جدا شده از روده بچه تاسماهی ایرانی که توسط شناور ماسوله (۱۳۹۱) استخراج شده بود، استفاده شد.

نمونه‌برداری خون

در پایان دوره تحقیق برای بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی و یونی پلاسمای خون، از ۲ قطعه ماهی از هر تکرار تیمارهای آزمایشی، ۲ میلی لیتر خون از ناحیه ساقه دمی برداشت شد. پس از سانتریفیوژ خون (مدل Labofuge شرکت Heraeus sepatch آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، پلاسمای نمونه‌های خون تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پلاسمای نمونه‌های خون برای بررسی شاخص‌های مختلف به

آزمایشگاه تخصصی ویرومد استان گیلان، شهرستان رشت منتقل شد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

جدول ۱ ترکیب جیره پایه غذایی تجاری مورد استفاده در تیمارهای مختلف آزمایشی و گروه شاهد.

نوع ترکیب	مقدار (٪)
پروتئین خام	۵۴
چربی خام	۱۵
فیبر خام	۰/۳
خاکستر	۱۰/۳
رطوبت	۱۰

سنجش شاخص‌های رشد

در پایان آزمایش، وزن کسب شده (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR)، فاکتور وضعیت (CF)، درصد افزایش وزن بدن (BWI) و (SGR) بچه ماهی در تیمارهای مختلف با استفاده از رابطه‌های ریاضی زیر تعیین شد:

وزن کسب شده[1] (WG)

$$WG = W_2 - W_1$$

نرخ رشد ویژه[2] (Taylor et al. 2006)

$$SGR = (Ln\ W_2 - Ln\ W_1)/day \times ۱۰۰$$

فاکتور وضعیت یا ضریب چاقی[3] (CF) (Grant et al. 2008)

$$CF = [W / L^3] \times ۱۰۰$$

درصد افزایش وزن بدن[4] (BWI)

$$BWI = (W1 - W_2/W_1) \times ۱۰۰$$

ضریب تبدیل غذا[5] (FCR)

$$FCR = Food\ given/animal\ weight\ gain$$

در برابری‌های فوق؛ W_1= وزن اولیه، W_2= وزن نهایی، W= وزن کل، L= درازای کل، وزن بر حسب گرم و درازا بر حسب سانتی-متر بود.

سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی

در پایان آزمون، شاخص‌های ایمنی و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون بچه ماهیان آزمایشی شامل آنزیم-های آسپارتات ترانس آمیناز (AST) و آلانین ترانس آمیناز (ALT) (با استفاده از کیت‌های سنجش ALT و AST شرکت پارس آزمون ایران به ترتیب با شماره کیت ۰۱۹- ۱-۴۰۰ و ۰۱۸-۴۰۰-۱ از روش آنزیماتیک/فتومتریک در طول موج ۳۴۰ نانومتر)، آلکالین فسفاتاز (ALP) (با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون به شماره ۰۰۲-۴۰۰-۱ و با روش آنزیماتیک/فتومتریک در طول موج ۴۰۵ نانومتر)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) (با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون به شماره ۰۲۲-۴۰۰-۱ و با روش آنزیماتیک/فتومتریک در طول موج ۳۴۰ نانومتر)، ایمونوگلوبین (IgM) (کیت اختصاصی ماهی IgM شرکت East Biopharm ایالات متحده آمریکا به شماره CK-E90917 به روش کدورت-سنجی و از طریق اسپکتروفتومتر مدل VIS-۲۱۰۰ شرکت

1- Weight Gain
2 - Specific growth rate
3 - Condition factor
4 - Body weight increase
5 - Food conversion ratio

UNICCO آمریکا در طول موج ۳۴۰ نانومتر) و فعالیت لیزوزیم (LA) (از روش کدورت‌سنجی و با استفاده از Elisa reader USA مدل Statfax ۲۱۰۰ در طول موج ۵۳۰ نانومتر)، اندازه‌گیری و محاسبه شد.

آزمایش‌های میکروبی

به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از روده بچه-تاسماهیان از روش Merrifield و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی اصلاح استفاده گردید. در پایان کار میدانی پروژه، برای ارزیابی فلور باکتریایی و باکتری‌های اسید لاکتیک، بچه‌ماهیان (از هر تکرار ۳ قطعه و هر تیمار ۹ قطعه) پس از انتقال به آزمایشگاه و زیست‌سنجی و ضدعفونی (سطح شکمی ماهی با الکل ۷۰٪، در شرایط استریل)، شکم ماهی شکافته شد. سپس روده از سایر بخش‌های دستگاه گوارش جدا و شکافته شد. پس از تخلیه محتویات آن، نخست روده سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو و سپس وزن گردید. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر محیط روده با سرم فیزیولوژی، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت روی محیط کشت TSA (Tryptone Soya Agar) و MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) به صورت سطحی کشت داده شد. سپس پلیت‌های حاوی بافت روده و محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت در شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند و پس از طی زمان انکوباسیون، رنگ‌آمیزی گرم و اطمینان از خالص‌بودن باکتری‌ها، شمارش بر حسب (Colony Forming Unit) CFU انجام گرفت (علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶).

روش‌های آماری

برای انجام این آزمایش از طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل استفاده شد. برای دسته‌بندی داده‌ها و به منظور تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزارهای Excel 2018 و SPSS 20 استفاده شد. پیش از انجام آزمون‌های آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از روابط سنجش نرمالیته (کولموگروف-اسیمرنوف)، بررسی شد. یکنواختی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون آماری Levene، تأیید شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها در تیمارهای مختلف، برای بررسی وجود اختلاف‌های آماری در ضرایب رشد و مقادیر فراسنجه‌های بیوشیمیایی و ایمنی پلاسمای خون تیمارها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک-طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون جداساز توکی با احتمال ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

عوامل فیزیکی و شیمیایی آب

در طول دوره آزمایش، دما، اکسیژن محلول، درصد اشباعیت و پی‌اچ آب مخازن پرورشی آزمایشی به ترتیب ۰/۱۶± ۲۰/۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱۲± ۶/۹۸ میلی‌گرم در لیتر، ۸۹/۳۵±۷۶/۱ درصد و ۰/۰۲± ۸/۲۳ در نوسان بود. فراسنجه-های فیزیکوشیمیایی در تیمارهای مختلف در طی دوره آزمون، در شرایط مناسب و فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($p>0/05$).

شاخص‌های رشد

نتایج این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های رشد بجز ضریب چاقی بچه‌ماهیان در تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p>0/05$). مقایسه شاخص‌های رشد در جدول ۲ آمده است.

همچنین، نتایج نشان داد که اگرچه شاخص ضریب تبدیل غذایی در همه تیمارها فاقد اختلاف معنی‌دار بود، اما در تیمار ۲ و شاهد (به ترتیب ۰/۱۲ ± ۰/۷۰ و ۰/۰۸ ± ۰/۷۰) در کم‌ترین مقدار و تیمارهای ۳ و ۴ (به ترتیب ۰/۰۶ ± ۰/۷۴ و ۰/۱۸ ± ۰/۷۳) در بیشترین مقدار قرار داشتند.

نتایج وزن و درازای کل بچه‌تاسماهی ایرانی در پایان ماه‌های اول و دوم پرورش نشان داد که بچه‌ماهیان تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی باکتری‌های پروبیوتیک از نظر وزنی و طولی فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر و نیز با گروه شاهد بودند ($p>0/05$) (جدول ۳). این نتایج نشان داد که با افزایش دوره پرورش، اختلاف فاصله وزنی بین بچه‌ماهیان تیمارهای حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد افزایش یافت، به طوری که بیشترین وزن در پایان آزمایش از آن تیمار ۲ (بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی $1/5\times10^{9}$ باکتری در گرم) (۹۷/۲۴ ± ۸۴/۳ گرم) و کم‌ترین وزن از آن ماهیان گروه شاهد (۶۰/۴۵ ± ۶۸/۲ گرم) بود (جدول ۳).

جدول ۲ میانگین شاخص‌های رشد بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمارهای مختلف آزمایشی (میانگین ± SE و n=۱۵۰).

شاخص‌های رشد	تیمارها			
	شاهد (بدون پروبیوتیک)	۱/۵×۱۰^۹ CFU/g	۳×۱۰^۹ CFU/g	۴/۵×۱۰^۹ CFU/g
وزن کسب شده (گرم)	۵۷/۹۲ ± ۵/۶۰	۷۴/۲۸ ± ۸/۹۱	۶۴/۹۴ ± ۲/۴۷	۶۴/۴۴ ± ۶/۰۷
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	۲/۷۷ ± ۰/۱۳	۳/۰۸ ± ۰/۱۵	۲/۹۲ ± ۰/۰۶	۲/۸۶ ± ۰/۱۱
درصد افزایش وزن بدن	۵۴۲/۵۳ ± ۵۴/۴۲	۶۹۴/۹۶ ± ۸۳/۸۴	۶۰۹/۴۹ ± ۵۰/۹۳	۵۸۴/۶۶ ± ۵۴/۰۰
ضریب تبدیل غذا	۰/۷۴ ± ۰/۰۸	۰/۶۴ ± ۰/۱۱	۰/۷۰ ± ۰/۰۴	۰/۶۹ ± ۰/۰۴
ضریب چاقی	۰/۳۴ ± ۰/۰۰ ab	۰/۳۶ ± ۰/۰۱ ab	۰/۳۳ ± ۰/۰۱ bc	۰/۳۳ ± ۰/۰۰ bc

حروف غیرمشابه هر ردیف بیانگر اختلاف معنادار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۳ میانگین وزن و طول کل بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمارهای مختلف آزمایشی (میانگین ± SE و n=۱۵۰).

شاخص های رشد	تیمارها			
	شاهد (بدون پروبیوتیک)	۱/۵×۱۰^۹ CFU/g	۳×۱۰^۹ CFU/g	۴/۵×۱۰^۹ CFU/g
وزن اولیه (گرم)	۱۰/۰ ± ۶۸/۰۶	۱۰/۰ ± ۶۹/۰۶	۱۰/۰ ± ۶۷/۰۶	۱۰/۰ ± ۶۸/۰۶
طول اولیه (سانتی‌متر)	۱۴/۰ ± ۳۶/۰۵	۱۴/۰ ± ۳۷/۰۵	۱۴/۰ ± ۴۱/۰۶	۱۴/۰ ± ۳۸/۰۶
وزن ماه اول (گرم)	۲۸/۰ ± ۳۱/۷۶	۲۸/۰ ± ۸۸/۸۵	۲۹/۰ ± ۳۲/۹۶	۲۷/۰ ± ۴۸/۷۵
طول ماه اول (سانتی‌متر)	۲۰/۰ ± ۳۵/۱۴	۲۰/۰ ± ۲۴/۲۲	۲۰/۰ ± ۵۷/۱۹	۲۰/۰ ± ۴۴/۱۳
وزن نهایی (گرم)	۶۸/۲ ± ۶۰/۴۵	۸۴/۳ ± ۹۷/۲۴	۷۵/۲ ± ۶۱/۲۰	۷۵/۲ ± ۴۶/۳۰
طول نهایی (سانتی‌متر)	۲۷/۰ ± ۵۱/۳۳	۲۸/۰ ± ۳۲/۴۸	۲۸/۰ ± ۲۹/۵۵	۲۸/۰ ± ۶۱/۴۲

شاخص‌های ایمنی و آنزیمی

نتایج مقادیر ایمنوگلوبین M این پژوهش نشان داد در حالی که بین تیمار ۲ و ۴ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (p>۰/۰۵)، اما این دو تیمار با تیمارهای ۳ و ۱ و همچنین، بین تیمارهای ۴ و ۱ اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) وجود داشت. بیشینه مقدار IgM در تیمار ۲ و کمینه آن نیز در تیمار ۱ مشاهده شد (جدول ۴). نتایج میزان فعالیت لیزوزیم نیز حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ۲ و ۳ (p>۰/۰۵) بود، اما تیمار ۴ با تیمار ۱ و دو تیمار ۲ و ۳ با تیمارهای ۴ و ۱ دارای اختلاف معنی‌دار بودند (p<۰/۰۵). بیشینه فعالیت این شاخص در ماهیان تیمار ۲ و کمینه آن در تیمار ۱ رخ داد (جدول ۴).

نتایج شاخص‌های آنزیم‌های کبدی (AST، ALT و ALP) نشان داد که حداقل مقدار این شاخص‌ها در تیمارهای ۲ و ۴ و بیشینه مقدار در تیمارهای ۱ و ۳ مشاهده شد (جدول ۴). تیمارهای ۲ و ۴ و نیز تیمارهای ۳ و ۱ با یکدیگر بدون اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) بودند، ولی تیمارهای ۲ و ۴ با ۳ و ۱ اختلاف معنی‌دار داشتند (p<۰/۰۵) (جدول ۴). بر پایه نتایج به دست آمده در این مطالعه، بیشینه مقدار آنزیم لاکتات دی-هیدروژناز در تیمار ۱ و کمینه آن در تیمار ۲ مشاهده شد. این شاخص آنزیمی نیز کم و بیش مشابه نتایج آنزیم‌های کبدی بود، به طوری که کلیه تیمارهای دارای جیره حاوی پروبیوتیک بین خود، فاقد اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) بودند، ولی با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) داشتند (جدول ۴).

جدول ۴ میانگین شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های کبدی خون بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمارهای مختلف (میانگین ± SE و ۶ = n).

آنزیم‌ها	تیمارها			
	شاهد (بدون پروبیوتیک)	۱/۵×۱۰^۹ CFU/g	۳×۱۰^۹ CFU/g	۴/۵×۱۰^۹ CFU/g
AST (واحد/لیتر)	۲۴۴/۷ ± ۸۷/۴۷[a]	۱۸۷/۳ ± ۲۵/۸۲[b]	۲۲۴/۹ ± ۳۷/۳۰[a]	۱۷۷/۱۸ ± ۲۵/۵۱[b]
ALT (واحد/لیتر)	۲۲/۰ ± ۵۰/۴۲[a]	۱۳/۰ ± ۲۵/۸۸[b]	۲۳/۱ ± ۳۷/۵۳[a]	۱۳/۱ ± ۸۷/۲۱[b]
ALP (واحد/لیتر)	۶۱۹/۱۴ ± ۱۲/۲[a]	۴۴۲/۳ ± ۳۷/۲[b]	۶۵۱/۴ ± ۰/۰۶[a]	۴۴۶/۱ ± ۸۷/۳[b]
LDH (واحد/لیتر)	۸۰۳/۱۹ ± ۶۲/۳۷[a]	۵۹۰/۱۷ ± ۱۲/۵۵[b]	۶۷۵/۴ ± ۸۷/۰۹[b]	۶۳۷/۲ ± ۶۲/۳۷[b]
IgM (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۲۴/۰ ± ۷۵/۵۶[c]	۳۶/۱ ± ۵۰/۴۳[a]	۲۸/۰ ± ۲۵/۸۲[b]	۳۴/۰ ± ۰۰/۹۲[a]
لیزوزیم (دقیقه/میلی‌لیتر/واحد)	۲۳/۰ ± ۲۵/۷۵[c]	۳۳/۰ ± ۲۵/۵۳[a]	۳۲/۰ ± ۸۷/۷۴[a]	۲۶/۰ ± ۸۷/۵۱[b]

حروف غیرمشابه هر ردیف بیانگر اختلاف معنادار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵).

شاخص‌های باکتریایی روده

نتایج شمارش باکتری‌های هوازی و غیرهوازی اختیاری روده بچه‌تاسماهی ایرانی نشان داد که در واحد سنجش، تعداد پرگنه باکتری‌های کل روده (در محیط کشت TSA) بچه-تاسماهی ایرانی تیمار ۲ با اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نسبت به دیگر تیمارها، کمتر بود. تیمارهای ۱، ۳ و ۴ نسبت به یکدیگر، فاقد اختلاف (p>۰/۰۵)، اما نسبت به تیمار ۲ دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۵). بر پایه همین نتایج، بیشینه تعداد کلنی باکتری‌های اسید لاکتیک (در محیط کشت MRS) شکل گرفته در روده بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمار ۲ و کمینه آن در تیمار ۱ مشاهده شد. تعداد پرگنه‌های شکل گرفته در روده بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمارهای مختلف نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بودند (جدول ۴). غذای کنسانتره کوپنز مورد مصرف بچه‌ماهیان در همه تیمارها فاقد هر گونه باکتری اسید لاکتیک بود.

جدول ۵ تعداد کلنی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری (در محیط کشت TSA) و اسید لاکتیک (در محیط کشت MRS) روده بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمارهای آزمایشی (میانگین ± SE و ۲ = n).

	تیمارها			
	شاهد (بدون پروبیوتیک)	۱/۵ × ۱۰^۹ CFU/g	۳ × ۱۰^۹ CFU/g	۴/۵ × ۱۰^۹ CFU/g
TSA (CFU/g)	۳۵۵۰۰۰۰ ± ۱۵۰۰۰۰[ab]	۱۸۱۶۰۰۰ ± ۱۱۰۰۰۰[b]	۱۱۳۰۰۰۰۰ ± ۵۰۸۵۶۰[a]	۶۳۵۰۰۰۰ ± ۴۵۰۰۰۰[a]
TSA (log-CFU/g)	۶/۵۵ ± ۰/۰۱[ab]	۶/۲۶ ± ۰/۰۸[b]	۷/۰۵ ± ۰/۲۱[a]	۶/۸۰ ± ۰/۰۲[a]
MRS (CFU/g)	۰ ± ۰[b]	۸۳۰۰۰ ± ۲۳۰۹[a]	۱۰۵۰۰ ± ۲۸۸[c]	۷۵۰۰ ± ۱۴۴۳[c]
MRS (log-CFU/g)	۰۰/۰۰ ± ۰/۰[d]	۴/۹۲ ± ۰/۰۱[a]	۴/۰۲ ± ۰/۰۱[b]	۳/۸۷ ± ۰/۰۹[c]

حروف غیرمشابه هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵).

بحث

شاخص‌های رشد

در این مطالعه مشخص شد که هرچند افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی برگرفته از روده تاسماهی ایرانی نتوانست پس از ۶۰ روز پرورش به طور معنی‌دار روی شاخص‌های رشد و وزن نهایی بچه‌تاسماهی ایرانی تأثیر بگذارد، اما این شاخص‌ها در تیمارهای استفاده شده از جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک به خصوص تیمار ۲ (۱/۵ × ۱۰^۹ باکتری در گرم) به مراتب بهبود یافته‌تر و بیش‌تر از تیمار ۱ (شاهد) بود. نتایج شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذایی قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) و یگانه و همکاران (۱۳۹۹) به ترتیب روی فیل‌ماهی جوان و بچه فیل‌ماهی و همچنین، Soltani و همکاران (۲۰۱۵) روی بچه‌تاسماهی ایرانی، Pourgholam

و همکاران (۲۰۱۷) روی تاسماهی سیبری و بقائی بهمبری و همکاران (۱۳۹۲) روی بچه فیل‌ماهی، مشابه نتایج مطالعه حاضر بود. به نظر می‌رسد که یکی از دلایل افزایش میزان رشد در نتیجه افزودن پروبیوتیک به غذا، ناشی از تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره در دستگاه گوارش میزبان به عنوان محصول فرعی سخت و ساز کربوهیدرات باشد که به عنوان منبع انرژی یاخته‌های پوششی روده عمل می‌کند. ضمناً پروبیوتیک‌ها تحریک‌کننده اشتها نیز هستند. آنها از این طریق سبب بهبود تغذیه به دلیل تولید ویتامین‌ها، دفع سموم جیره و شکستن ترکیبات غیرقابل گوارش غذا (Abdelhamid et al. 2004) شده، در نهایت روی شاخص‌های رشد به دلیل مصرف بهتر کربوهیدرات، پروتئین و انرژی (Irianto and Austin, 2002)، تأثیر مثبت می‌گذارند. همچنین، افزایش رشد ماهی موجب افزایش ترشح آنزیم شده، این امر باعث بهبود سلامتی ماهی و در نتیجه، سبب افزایش قابلیت هضم مواد غذایی می‌شود (Ringo and Gatesoup, 1998) که کاهش ضریب تبدیل غذا در تیمار مناسب مطالعه حاضر (تیمار ۲) را توجیه می‌کند. دلیل عمده بهبود SGR، تسهیل فعالیت‌های آنزیمی و کمک به گوارش بهتر به واسطه تولید آنزیم‌های بیرونی توسط باکتری‌های مورد استفاده است (Ghosh et al. 2002)، زیرا با افزایش فعالیت آنزیمی، تولید ویتامین B_{12} و در پی آن، کوآنزیم‌های مرتبط با چرخه تولید انرژی را نیز می‌توان از دلایل افزایش SGR دانست (Gatesoupe, 1999). نتایج پروژه حاضر نشان داد که تیمارهای واجد تعداد بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک نسبت به بچه‌ماهیان گروه شاهد از ضریب چاقی و رشد کمتری برخوردار بودند که به نظر می‌رسد این موضوع به دلیل تداخل عملکرد بیش از حد باکتری‌های پروبیوتیک در سوخت و ساز طبیعی بدن (سادات حسینی مدنی و همکاران، ۱۳۹۳) و رقابت آنها با یاخته‌های بدن ماهی در جذب اسید فولیک موجود در جیره غذایی (Mohan et al. 1996) باشد. در واقع، هر گونه تغییر بیش از اندازه ساختار طبیعی بدن (هر چند مثبت) می‌تواند عملکرد و بازخورد منفی داشته باشد.

شاخص‌های ایمنی و آنزیمی

نتایج نشان داد که بیشینه مقدار IgM با اختلاف معنی‌دار در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۱ (شاهد) که در کمینه مقدار قرار داشت، مشاهده می‌شود. این نتایج با نتایج مطالعات انجام شده روی فیل‌ماهی جوان (قربانی واقعی و همکاران، ۱۳۹۹)، بچه-تاسماهی‌ایرانی (علیزاده و همکاران ۱۳۹۶؛ Soltani et al. 2015)، هم‌سو بود. افزایش مقدار IgM را می‌توان به علت وجود باکتری‌های اسید لاکتیکی دانست که تولید پادتن را تحریک می‌کنند (Malin et al. 1996)، اما نتایج پژوهش یگانه و همکاران (۱۳۹۹) روی بچه فیل‌ماهی و دلسوز خاکی (۱۳۹۲) روی تاسماهی شیپ نشان داد که مقدار IgM پلاسمای خون به عنوان یک شاخص ایمنی اختصاصی بدون اختلاف معنی‌دار، کمتر از پلاسمای خون ماهیان گروه شاهد است. به نظر می‌رسد که با افزایش مدت زمان پرورش و تغذیه با جیره‌های پروبیوتیک بتوان این تأثیر را در پلاسمای خون ماهیان بهتر مشاهده کرد (Nikoskelamin et al. 2003).

بر پایه نتایج این تحقیق، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم پلاسمای خون بچه‌تاسماهی ایرانی تغذیه‌شده با باکتری‌های پروبیوتیکی به خصوص تیمار ۲ با اختلاف معنی‌دار نسبت به بچه تاسماماهیان گروه شاهد بیشتر بود. با توجه به این که میزان فعالیت لیزوزیم، شاخص مناسبی برای ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس‌زا محسوب می‌شود (Kim & Austin, 2006)، می‌توان عنوان کرد که پروبیوتیک‌ها با افزایش فعالیت لیزوزیم سبب مرگ پروتوپلاست باکتری‌های زیان‌بار شده (Fast et al. 2002)، شرایط زیستی و در نهایت رشد ماهی را بهینه خواهند کرد، زیرا فعالیت لیزوزیم به دنبال افزایش فرآورده‌های میکروبی و در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و جیره غنی از پروبیوتیک در پلاسمای ماهیان افزایش می‌یابد (تکمه‌چی، ۱۳۸۶). نتایج مطالعات قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) روی فیل‌ماهی جوان با اختلاف معنی‌دار و یگانه و همکاران (۱۳۹۹) روی بچه فیل‌ماهی و بدون اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. اما نتایج مطالعه علیزاده نوذری و شاپوری (۱۳۹۶) روی فیل‌ماهی جوان همخوان با نتایج مطالعات فوق نبود. البته اختلاف نتایج در زمینه فعالیت

لیزوزیم در مطالعات مختلف را می‌توان ناشی از سن و گونه و باکتری‌های پروبیوتیکی مورد آزمایش دانست.
مطالعه پورفتاحی و همکاران (۱۳۹۴) روی فیل‌ماهی جوان همانند نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک به‌طور معنی‌دار سبب کاهش آنزیم‌های ALT، ALP کبدی شدند. این درحالی است که نتایج پژوهش قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) روی فیل‌ماهی جوان، هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر نبود. نتایج پژوهش‌های شناور ماسوله (۱۳۹۱) و Soltani و همکاران (۲۰۱۵) نیز روی بچه-تاسماهی ایرانی نشان دادند که مقادیر AST، ALT، ALP در تیمارهای حاوی باکتری‌های پروبیوتیک نسبت به ماهیان گروه شاهد، بدون اختلاف معنی‌دار، کم‌تر بود، اما نتایج پژوهش یگانه و همکاران (۱۳۹۹) روی بچه فیل‌ماهی نشان داد که تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بودند، ولی کمینه مقدار این آنزیم‌ها در تیماری رخ داد که دارای بیشینه رشد بود (تیمار حاوی باکتری‌های پروبیوتیک). بنابراین، پروبیوتیک‌های مختلف و حتی مشابه، ممکن است پاسخ های ایمنی متفاوتی در سنین مختلف یک گونه یا گونه‌های مختلف به دنبال داشته باشند. از طرف دیگر، ممکن است در یک گونه ماهی نیز استفاده از مقادیر مختلف پروبیوتیک با نسبت‌های مختلف غذادهی، اثرات متفاوتی بر شاخص‌های ایمنی بروز کند. برخی از پژوهشگران بر این باورند که افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی نمی‌تواند همواره بیانگر عملکرد منفی آن باشد (Allameh et al. 2017). بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را باید از جنبه‌های مثبت و منفی (آسیب‌های کبدی) ارزیابی کرد. افزایش آنزیم-های ALT، AST و ALP پلاسمای خون ممکن است بیانگر شرایط بد تغذیه‌ای یا محیطی ماهی نیز باشد (Abdelhamid et al. 2004) و احتمالاً آسیب بافت‌هایی چون کبد ممکن است سبب افزایش این آنزیم‌ها شود (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۶). کاهش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در پلاسمای خون ماهیان تحت تأثیر پروبیوتیک، ممکن است بیانگر سلامتی بافت و عملکرد کبد و شرایط مناسب تغذیه‌ای آنها باشد.
بر پایه نتایج این مطالعه، کمینه و بیشینه مقدار آنزیم LDH نیز با اختلاف معنی‌دار به ترتیب در تیمار دارای بهترین شاخص‌های رشد، ایمنی و آنزیمی (تیمار ۲) و تیمار شاهد مشاهده شد. در پژوهش قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) این نتایج هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر نبود. همچنین Soltani و همکاران (۲۰۱۶) و علیزاده و همکاران (۱۳۹۶) روی بچه-تاسماهی ایرانی و یگانه و همکاران (۱۳۹۹) روی بچه فیل-ماهی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین مقادیر آنزیم LDH تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نکردند. افزایش غلظت LDH در همولنف ممکن است ناشی از آزادسازی لیزوزیم از بافت‌های تخریب شده باشد (Agrahari et al. 2007). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، افزودن پروبیوتیک به غذا توانسته است از میزان آزادسازی آنزیم LDH بکاهد. بنابراین، اگر شرایط محیطی تغذیه‌ای، تغییر سوخت و ساز را باعث شوند، می‌توانند با تغییر غلظت آنزیم‌هایی چون لاکتات دی‌هیدروژناز روی پیامدهای فیزیولوژیک تأثیر بگذارند (Luskova et al. 2002).

کلنی باکتری‌های روده

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تعداد پرگنه باکتری‌های هوازی و غیر هوازی اختیاری روده بچه‌تاسماهی ایرانی در تیمار ۲ و تیمار ۱ به ترتیب با اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر تیمارها کمتر و بیشتر بود. تعداد پرگنه باکتری‌های پروبیوتیکی روده بچه‌ماهیان نیز در تیمارهای ۲ و شاهد به‌ترتیب با اختلاف معنی‌دار در بیشینه و کمینه تعداد پرگنه قرار داشتند. در نتایج مطالعه قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) در فیل‌ماهی جوان اگرچه اختلاف معنی‌داری در تعداد کلنی باکتریایی محیط کشت MRS در تیمارهای مختلف روده مشاهده نشد، اما تعداد آنها در تیمار با تراکم کم بیش از دیگر تیمارها بود. با وجود این، یگانه و همکاران (۱۳۹۹) در بچه فیل‌ماهی بیشترین تعداد پرگنه باکتری‌های عمومی را در گروه شاهد و کمترین را در تیمار واجد تراکم بالای باکتری‌های پروبیوتیک مشاهده کردند. همچنین، آنها تعداد باکتری‌های پروبیوتیک روده ماهیان شاهد را همانند مطالعه حاضر صفر پرگنه، اما بیشینه آن را در تیمار واجد تراکم بالای پروبیوتیک گزارش کردند. تأثیر مثبت باکتری‌های پروبیوتیک در عملکرد تغذیه، رشد و ایمنی زمانی مؤثر و پایدار خواهد بود که غذای حاوی پروبیوتیک به صورت پیوسته برای حفظ سطح

پروبیوتیک باکتریایی روده به ماهی داده شود. همچنین هم‌سو با مطالعه حاضر، نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داد که با افزایش تعداد پرگنه باکتری‌های پروبیوتیک در غذا، در دستگاه گوارش ماهی نیز فلور باکتریایی روده (باکتری‌های هوازی و غیرهوازی اختیاری) کاهش یافت (شناور و همکاران، ۱۳۹۵). دلیل این امر، غالبیت باکتری‌های پروبیوتیک و استقرار (کلونیزاسیون) خوب آنها در روده اعلام شد. البته برخی از محققان از جمله شناور و همکاران (۱۳۹۵) و Naseri و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که با افزایش میزان غنی-سازی و افزایش پروبیوتیک غذا تعداد آنها به ترتیب در روده تاسماهی ایرانی و قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می یابد. با وجود این، در مطالعه حاضر با افزایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک جیره غذایی، از تعداد باکتری‌های پروبیوتیکی روده کاسته شد. بنابراین، استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک اختصاصی اگرچه سبب افزایش مناسب فلور باکتریایی روده تاسماهی ایرانی می‌شوند، اما این باکتری‌ها باید در مقدار مشخصی به غذای مورد استفاده ماهی افزوده شود تا نتایج مثبت آن روی شاخص‌های رشد، ایمنی و تعداد باکتری‌های مفید بروز کند زیرا رقابت غذایی و زیستی بین باکتری‌ها و نیز تغییرات محیطی حاصل از زیست آنها، عوامل محدود کننده افزایش تعداد باکتری‌ها هستند. بنابراین، می‌توان عنوان کرد که افزایش تعداد باکتری‌های سودمند (پروبیوتیک) در محیط کشت MRS که محیط کشت اصلاح شده برای لاکتوباسیل‌ها (پروبیوتیک بی‌هوازی اختیاری و برخی از گونه‌های اجباری) است و نیز کاهش تعداد پرگنه‌های فلور باکتریایی عمومی در محیط کشت TSA روده بچه‌ماهیان تیمار ۲ نسبت به گروه شاهد و دیگر تیمارها بیانگر نقش مفید سویه‌های باکتریایی افزوده شده به جیره غذایی بچه‌تاسماهی ایرانی بر فلور باکتری‌های مفید روده است.

این مطالعه نشان داد که با افزودن باکتری‌های گروه اسید لاکتیک روده تاسماهی ایرانی (*Lactococcus lactis*، *Pediococcus pentosaceus*، *Weissella cibaria* و *Enterococcus faecalis*) به جیره غذایی بچه-تاسماهی ایرانی در بازه وزنی ۱۰۰-۱۰ گرم با تراکم $۱۰^{۹}$ × ۱/۵ باکتری در گرم، می‌توان رشد و دستگاه ایمنی آنها را بهبود بخشید. این مهم زمانی رخ خواهد داد که باکتری‌های پروبیوتیکی مورد نظر به طور پیوسته به جیره غذایی ماهی در بازه زمانی پرورش افزوده شود.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران در بخش‌های فیزیولوژی و بیوشیمی، آبزی-پروری و بهداشت و بیماری‌های مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان و نیز آزمایشگاه ویرومد رشت به خصوص آقای مهدی ملکی که ما را در اجرای این مطالعه یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

بقائی بهمبری، ک.، فعانی لنگرودی، ح.، طلوعی، م.ح.، سمیعی اردکانی، م.ه. ۱۳۹۲. بررسی اثر پروبیوتیک باکتوسل بر فاکتورهای زیستی بچه فیل‌ماهیان (*Huso huso*). علوم تکثیر و آبزی‌پروری ۱: ۳۴-۲۱.

بینایی، م.، قیاسی، م.، پورغلام، ر.، نقوی، ع.ر.، سعیدی، ع.ا. ۱۳۹۰. بررسی فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی و ایمنی فیل‌ماهی پرورشی تغذیه شده با پروبیوتیک باکتوسل (Bactocell). اولین همایش ملی آبزی پروری ایران ۹-۸ آذر ۱۳۹۰، بندر انزلی، ایران.

تکمه‌چی، ا. ۱۳۸۶. تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکئی (به عنوان یک پروبیوتیک) بر روی برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه دکترای تخصصی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه.

جعفریان، ح.، آذری‌تاکامی، ق.، کمالی، ا.، سلطانی، م. ۱۳۸۶. استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی غنی شده با ناپلی‌آرتمیا ارومیانا به منظور رشد و بقا لاروهای تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*. علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۴: ۸۷-۷۷.

خالقی، م.، سلطانی، م.، حسینی شکرآبی، س.پ. ۱۳۹۷. اثر افزودن مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (دی پرو آکوآ) به جیره غذایی بر برخی شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). زیست‌شناسی دریا ۱۰: ۲۰-۱۱.

دلسوز خاکی، ن.، خارا، ح. محسنی، م.، شناور ماسوله، ع.ر. ۱۳۹۲. بررسی اثرات پروبیوتیک باکتوسل و اسید فولیک بر روی فاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ. فیزیولوژی و تکوین جانوری ۶: ۱۳-۱.

سادات‌حسینی مدنی، ن.، غفاری فارسانی، ح. ۱۳۹۳. مروری بر استفاده از پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها در آبزی‌پروری و تاثیر آنها بر عملکرد دستگاه گوارش آبزیان. ۱۳۹۷. مجله شیل ۶: ۱۰۱-۹۴.

شناور ماسوله، ع. ۱۳۹۱. شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک روده بچه‌تاسماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) و کارآیی آنها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنو فیزیولوژی. رساله دکتری. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۴۰ صفحه.

شناور ماسوله، ع.، سلطانی، م.، احمدی، م.ر.، پورکاظمی، م.، طاهری میرقائد، ع.ط. ۱۳۹۵. تاثیر تغذیه لاکتوکوکوس لاکتیس بر وضعیت فلور باکتریایی روده تاسماهی ایرانی و مواجهه سازی با آئروموناس هیدروفیلا. مجله تحقیقات دامپزشکی ۷۱: ۳۱۰-۳۰۳.

عسگری‌فر، ص.، هدایتی‌فر، م.، خارا، ح. ۱۳۹۴. بهبود شاخص-های رشد، بازماندگی، فاکتورهای خونی و ایمنی و تراکم باکتریایی روده ماهی آزاد دریای مازندران (*Salmo trutta caspius*, Kessler, 1870) تحت تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک بتاپلاس. فیزیولوژی و بیوشیمی آبزیان ۳: ۲۶-۱.

علیزاده رودپشتی، م.، شناور ماسوله، ع.، جلیل‌پور، ج.، معصوم زاده، م.، بازاری مقدم، س.، یگانه، ه.، عزیززاده، ل. ۱۳۹۶. اثر *Enterococcus faecalis* به عنوان پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی و سرمی بچه تاسماهیان ایرانی (*Acipencer persicus*). نشریه توسعه آبزی‌پروری ۱۱: ۱۰۳-۸۹.

علیزاده نوذری، م.، شاپوری، م. ۱۳۹۶. بررسی تأثیر پروبیوتیک آلفامیون بر شاخص‌های رشد، پارامترهای بیوشیمیایی خون و ترکیب لاشه فیل‌ماهی پرورشی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران ۲۶: ۱۵۹-۱۵۱.

قربانی واقعی، ر.، کاظمی، ر.، شناور ماسوله، ع.، حسین‌پور زلتی، ع.، علیپور جورشری، ع.، یگانه راسته کناری، ه.، یوسفی جوردهی، ا.، کامرانجو، ق.، صیادفر، ج.، علیزاده رودپشتی، م.، جلیل‌پور رودکلی، ج.، حلاجیان، ع.، فرهبد، ا.، بازاری مقدم، س.، ساسانی، ب.، نظری، م. ۱۳۹۹. گزارش نهایی پروژه "بررسی اثر پروبیوتیک بومی بر شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی و ایمنی فیل‌ماهی جوان پرورشی (*Huso huso*)". شماره مصوب ۱۲-۳۲-۳۲-۰۰۸-۹۶۰۳۱-۹۶۰۸۵۰، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، ۷۲ ص.

قشقایی، ر.، لایق، م. ۱۳۸۳. پروبیوتیک‌ها. انتشارات نقش مهر، چاپ اول، ۸۳ ص.

قشلاقی، پ.، رشیدیان، ق.، چهارده بالایی، ا.، باقری، ط.، غفاری فارسانی، ح. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح سین بیوتیک بایومین ایمبو بر پارامترهای رشد، بقا، آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای ایمنی موکوس ماهی سوروم (*Heros severus*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان ۳: ۷۹-۴۹.

کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان، ۱۹۴ ص.

کاظمی، ر.، نوری، ف.، بانی، ع.، حسین نجدگرامی، ا.، یزدانی ساداتی، م.ع. ۱۳۹۵ب. اثرات دوره‌های مختلف نوری و شدت نور روی رشد، بازماندگی و تغییرات حجم کیسه زرده لارو تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*. بوم-شناسی آبزیان ۴: ۳۲-۲۲.

مصلحی، ف.، ستاری، م.، خوش‌خلق، م.ر.، شناور ماسوله، ع.ر.، عباسعلی‌زاده، ع.ر. ۱۳۹۳. اثر پروبیوتیک (*Pediococcus pentosaceus*) بر عوامل رشد و ایمنی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). علوم و فنون شیلات ۳: ۹۲-۸۱.

هاشمی مفرد، م.، ستاری، م.، خوش‌خلق، م.ر.، شناور ماسوله، ع.، عباسعلی‌زاده، ع. ۱۳۹۵. مطالعه تأثیر باکتری *Weissella cibaria* بر فاکتورهای رشد در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). مجله علمی شیلات ایران ۲۵: ۲۷-۱۷.

یگانه راسته‌کناری، ه.، کاظمی، ر.، شناور ماسوله، ع.، سید-حسنی، م.ح.، حسین‌پور زلتی، ع.، قربانی واقعی، ر.، یوسفی جوردهی، ا.، حلاجیان، ع.، علیپور جورشری، ع.، جلیل‌پور رودکلی، ج.، علیزاده رودپشتی، م.، صیادفر، ج.، عاشوری، ع.، حسین‌نیا، ا.، امین دلدار، ب.، عسکری‌نژاد قاضیانی، ح. ۱۳۹۹. گزارش نهایی پروژه "تعیین اثرات افزودن پروبیوتیک بومی به جیره غذایی، بر شاخص‌های رشد، ایمنی، بیوشیمیایی بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*)، شماره مصوب ۹۶۰۸۵۱-۹۶۰۳۱-۰۰۹-۳۲-۳۲-۱۲، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، ۷۰ صفحه.

Abdelhamid, A.M., Abdelkhalek, A.E., Mehrm, A.I., Khalil, F.F. 2004. An attempt to alleviate aflatoxicosis on Nile tilapia fish by dietary supplementations with chicken-hatchery by-products (eggshells) and shrimp processing wastes (shrimp shells) 2-On clinical, blood and histological parameters. Journal of Agricultural Science 29: 6175-6196.

Agh, N., Irani, A., Tokmechi, A., Azizpour, K. 2009. Survival and growth studies of *Acipenser persicus* larvae fed with Artemia nauplii enrich with two strains of *Lactobacillus delbrukii* bulgaris. Aquaculture, Malasia, 8 p.

Agrahari, S., Pandey, K.C., Gopal, K. 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). Pesticide Biochemistry and Physiology 88: 268-272.

Allameh, S.K., Noaman, V., Nahavandi, R. 2017. Effects of probiotic bacteria on fish performance. Advanced Techniques in Clinical Microbiology,1 :1-5.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., Ringo, E. 2011. The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. Aquaculture Nutrition 17: 488-497.

Carmona, R., Domezain, A., Garcia-Gallego, M., Antonio Hernando, I., Rodriguez, F., Ruiz-Rejon, M. 2009. Biology, Conservation and sustainable development of sturgeon. Springer Publication, Berlin, Germany.

Delsoz, N., Khara, H. Shenavar, A.R., Mohseni M. 2017. Interaction of dietary Pediococcus acidilactici and folic acid on growth performance, haematological parameters and nonspecific immune response of finger barbel, *Acipenser nudiventris*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 16: 869-883.

Faramarzi, M., Jafaryan, H., Patimar, R., Iranshahi, F., Boloki, M.L., Farahi, A. 2011. The effect of different concentrations of probiotic Bacillus spp. and different bioencapsulation times on growth performance and survival rate of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. World Journal of Fish and Marine Sciences 3: 145-150.

Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W. 2002. Skin morphology and hormonal non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, Coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology 132A: 645-657.

Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. 2002. Growth and survival of Rohu, *Labeo rohita* spawn fed diet supplemented with fish intestinal microflora. Acta Ichthyologica et Piscatoria 32: 83-92.

Grant, A.A.M., Baker, D., Higgs, D.A., Brauner, C.J., Richards, J.G., Balfry, S.K., Schulte, P.M. 2008. Effects of dietary canola oil level on growth, fatty acid composition and osmoregulatory ability of juvenile fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 277: 303-312.

Hai, N.V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology 119: 917-935.

Iranshahi, F., Faramarzi, M., Kiaalvandi, S., Boloki, M.L. 2011. The enhancement of growth and feeding performance of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae by *Artemia urmiana* nauplii bioencapsulation via baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Journal of Animal and Veterinary Advances 10: 2730-2735.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Probiotic in aquaculture. Journal of Fish Disease 25: 633-642.

Kazemi, R., Yarmohammadi, M., Hallajian, A., Jalilpour, J., Esmaeili, F. 2020. Influence of the photoperiod and light intensity on growth performance, Melatonin and Insulin-like growth factors gene expression on *Acipenser persicus* during the embryonic stage. Iranian Journal of Fisheries Sciences 19: 1175-1192.

Kim, D.H., Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology 21: 513-524.

Luskova, V., Svoboda, M., Kolaova, J. 2002. The Effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinary Brno 71: 117-123.

Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M. 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus*, GG. Annals of Nutrition and Metabolism 40: 137-45.

Martinez, Cruz, P., Ibanez, I., Hermosillo. O.C., Saad, H. 2012. Use of probiotics in aquaculture. International Scholarly Research Network Microbiology.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B., Davies, S.J. 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition 17: 73-79.

Moham, B., Kadirvel, R., Natarajan, A., Bhaskaran, M. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. British Poultry Science 37: 395-401.

Naseri, S., Khara, H., Shakoori, M. 2013. Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) fry. Journal of Animal Research 41: 318-325.

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

Pourgholam, M.A., Khara, H., Safari, R., Yazdani Sadati, M.A., Aramli, M.S. 2017. Influence of *Lactobacillus planetarium* inclusion in the diet of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on performance and hematological parameters. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 17: 1-5.

Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. Aquaculture 160: 177-20.

Salaghi, Z., Imanpour, M., Taghizadeh, V. 2013. Effect of different levels of probiotic primalac on growth performance and survival rate of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Global Veterinaria 11: 238-242.

Soltani, M., Shenavar Masouleh A., Ahmadi, M., Pourkazemi, M., Taherimirghaed, A. 2015. Antibacterial activity, antibiotic susceptibility and probiotic use of lactic acid bacteria in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health 2: 54-65.

Subharanjani, S., Gunarani, R., Prema, P., 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.

Taylor, J.F., North, B.P., Porter, M.J.R., Bromage, N.R., Migaud, H. 2006. Photoperiod can used to enhance growth and improve feeding efficiency in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 256: 216-234.

Yanbo, W., Zirong, X. 2006. Effects of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Journal of Animal Feed Science and Technology 127: 283-292.

Zare, A., Azari-Takami, G., Taridashti, F., Khara, H. 2015**.** The effects of *Pediococcus acidilactici* as a probiotic on growth performance and survival rate of great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Iranian Journal of Fisheries Sciences 16: 150-161.