فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۸، جلد ۱۳، شماره ۱، زمستان ۹۸، صفحه ۶۹ تا ۸۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی اثر لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مانان الیگوساکارید بر رشد و برخی فاکتورهای گوارشی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد حامد نجفی انفرادی[۱]، **فلورا محمدی زاده[۱]**، مهدی سلطانی[۲]، امیر هوشنگ بحری[۱]، نجمه شیخ زاده[۳]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، بندرعباس، ایران. **fmohammadi13@gmail.com**
۲- گروه بهداشت وبیمارهای آبزیان،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه تهران،تهران، ایران.
۳-گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
تاریخ دریافت:۹۸/۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱

چکیده

زمینه و هدف: رشد سریع و مقاومت بالا در پرورش ماهی امری بسیار مهم است، لذا بررسی ترکیبات افزودنی نظیر پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک که سبب بهبود رشد و افزایش مقاومت در گونه پرورشی هدف شود بسیار مورد توجه محققین در سال-های اخیر بوده است.

روش کار: در این مطالعه به منظور بررسی اثر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم(*Lactobacillus plantarum*) و قند مانان الیگوساکارید(Mannan Oligosaccharides) بر رشد و برخی فاکتورهای گوارشی ماهی قزل آلای رنگین کمان، تعداد ۲۷۰ عدد ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۲۸/۸ گرم به صورت کاملاً تصادفی در قالب ٦ تیمار مختلف پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک و در ۳ تکرار توزیع شدند. گروه پروبیوتیک در دو تیمار آزمایشی ۰/۳ و ۰/۵ گرم از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر کیلوگرم غذا، گروه پری بیوتیک در یک تیمار آزمایشی به میزان ۲ گرم مانان الیگوساکارید بر کیلوگرم غذا و گروه سینبیوتیک در دو تیمار(۰/۳ گرم باکتری مذکور به همراه ۲ گرم مانان الیگوساکارید بر کیلوگرم غذا) و تیمار(۰/۵ گرم باکتری مذکور به همراه ۲ گرم مانان الیگوساکارید بر کیلوگرم غذا) به مدت ٤٥ روز غذادهی شدند. در پایان دوره آزمایش به منظور بررسی هر یک از شاخص های مورد مطالعه تعداد ۱۵ عدد ماهی بطور کاملا تصادفی صید گردیده و روش های مختلف زیست سنجی، کالری متری و بررسی میکروسکوپی مورد ارزیابی واقع شدند.

یافته ها: پژوهش حاضر، افزایش معنادار فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی مورد بررسی را متعاقب مصرف باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دوزهای ۰/۳ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم غذا در تیمارهای پروبیوتیک و سینبیوتیک در قیاس با تیمار شاهد نشان داد (P<0.05).

واژه های کلیدی: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، مانان الیگوساکارید، رشد، آنزیم های گوارشی، *Oncorhynchus mykiss*.

مقدمه

بهبود عملکرد پرورش به مفهوم رشد بیشتر و مقاومت ایمنی بالاتر آبزی همواره به عنوان مهم‌ترین دغدغه پرورشی، مورد توجه فعالان این صنعت بوده است. بدین منظور مطالعات زیادی در خصوص یافتن ترکیبات مناسب جهت ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری زا در زمان بروز استرس های فراوان حین دوره پرورش و افزایش رشد در گونه های مختلف ماهی انجام شده است(۲۳). از این گونه ترکیبات مورد استفاده در آبزیان می توان به ترکیبات صناعی، مشتقات باکتریایی و قارچی، ویتامین ها، هورمون ها و ترکیبات

حیوانی اشاره نمود(۴۰). در کل افزایش رشد متعاقب استفاده از این نوع ترکیبات به دلایل مختلفی رخ می-دهد. اولاً افزایش رشد ممکن است به دلیل کاهش میزان باکتری های بیماری زا و افزایش باکتری های مفید در روده ماهی رخ دهد(۷،۱۲). دلیل دیگر، بهبود فعالیت و ساختار روده و متعاقب آن افزایش قابلیت جذب در ماهی می باشد. در مطالعات انجام شده توسط Burrells و همکاران طول خمل های قسمت های مختلف روده و میزان سطح جذب روده در آزاد ماهی اقیانوس اطلس با خوراندن نوکلئوتیدها افزایش یافت(۹). خوراندن مانان اولیگوساکارید در ماهی کوبیا(*Rachycentron canadum*) و ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز سبب افزایش طول و تراکم ریزخمل-های روده در مقایسه با گروه کنترل گردید(۳۹ ،۱۲). استفاده از ارگوسان در ماهی تیلاپیا نیز سبب افزایش طول خمل های روده و افزایش سطح جذب در روده گردید(۲۹). افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی متعاقب استفاده از ترکیبات مختلف در جیره غذایی ماهی نیز از علل دیگر افزایش رشد می باشد. به عنوان مثال، مخمر ساکارومیسس سروزیه سویه بولاردی در ماهی قزل آلای رنگین کمان سبب افزایش فعالیت های آنزیم های روده گردید(۵۲). در مطالعه Nya و Austin نیز افزایش فعالیت های معده و روده شامل پپسین، آنزیم های پروتئولیتیک، تریپسین و آلکالین فسفاتاز متعاقب استفاده از مواد محرک ایمنی مانند سیر، زنجفیل و لیپو پلی ساکارید نشان داده شد(۳۳). یکی از ترکیبات افزودنی موثر در جیره غذایی ماهی که به ویژه در سال های اخیر مورد توجه محققین زیادی واقع شده، ترکیبات پروبیوتیک بوده است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم های زنده ایی هستند که اگر به میزان کافی مصرف شوند با حفظ تعادل جمعیت میکروبی روده بر سلامت مصرف کننده اثرات مطلوبی می-گذارند. به طور کلی میکروارگانیسمی می تواند به عنوان پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرد که قادر به عبور از معده و روده بوده و در مجرای گوارشی تکثیر یابد. هم‌چنین با تولید متابولیت های آنتاگونیستی با میکروفلور ساپروفیت رقابت کند. این توانایی در گروه مهمی از باکتری های اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیل‌ها شایع است. در سیستم ایمنی پایه، پروبیوتیک ها با سلول‌های ایمنی مانند سلول های تک هسته-ای(مونوسیت ها، ماکروفاژها) و به منظور افزایش پاسخ ایمنی ذاتی ارتباط برقرار می کنند. پروبیوتیک ها در ماهیان مختلف می توانند تعداد گلبول های قرمز را افزایش دهند. فعالیت فاگوسیتوزی پاسخی اولیه و فعال به پاسخ های التهابی قبل از تولید آنتی بادی است. پروبیوتیک ها می توانند به صورت فعالی باعث شروع تولید سلول های فاگوسیتوزی در میزبان و افزایش فرآیند بیگانه خواری خصوصاً توسط گروه لاکتوباسیلوس ها شوند. پروبیوتیک ها هم‌چنین به طور منفرد یا ترکیبی باعث آزاد شدن سطوح بالای لیزوزیم در ماهیان استخوانی می شوند. به جز محتوای سرم لیزوزیم، پروبیوتیک ها هم‌چنین می توانند به افزایش سطح لیزوزیم در مخاط پوست کمک نمایند. در ماهیان استخوانی، نقش فعالیت کمپلمان به عنوان یک نقش کلیدی در پاسخ به ایمنی شناخته شده است. پروبیوتیک‌ها می توانند فعالیت کمپلمان طبیعی ماهی را بالا برده و به رشد سلول کمک کنند(۲۸). در مقابل اصلاح پری بیوتیک به ترکیبات غذایی غیر قابل هضم یا با هضم پذیری اندک در مقابل آنزیم های گوارشی گفته می‌شود که با تحریک انتخابی رشد و یا فعالیت باکتری ها در کولون، تاثیرات مثبتی بر میزبان می-گذارند. بنابراین پری بیوتیک ها باعث بهبود و تعادل میکروفلور روده و افزایش مکانیزم دفاعی میزبان می-شوند. مهم ترین محصول حاصل از متابولیسم پری

بیوتیک ها اسیدهای چرب زنجیرکوتاه است که از طریق اپی‌تلیوم روده جذب و به عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و باعث بهبود جذب مواد غذایی می شوند. تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه مانند استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید لاکتیک ناشی از تخمیر پری بیوتیک ها، منجر به کاهش pH روده می‌شود که شرایط مناسب را برای رشد باکتری های اسید لاکتیک فراهم می‌کند(۵۱). سینبیوتیک ها ترکیبی از پروبیوتیک ها و پری بیوتیک ها هستند که با افزایش بقا و ورود مکمل های میکروبی زنده به دستگاه گوارش اثرات مثبتی بر میزبان دارند. در واقع سینبیوتیک ها برای کمک به حفظ غالبیت باکتری های پروبیوتیکی در میکروبیوتای روده ای ماهی از پری-بیوتیک ها یا الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم استفاده می کنند. اثر سین بیوتیکی مستلزم توانایی باکتری پروبیوتیکی برای تخمیر پری بیوتیک است که متاثر از درجه پلی مریزاسیون آن است. به همین علت برای معرفی یک ترکیب سین بیوتیکی، بررسی قابلیت تخمیر و رشد باکتری تحت تاثیر پری بیوتیک به عنوان سوبسترا باید در نظر گرفته شود(۳۷، ۵). تاکنون مطالعات خوبی جهت بررسی تاثیر عملکرد پری-بیوتیک، پروبیوتیک و سینبیوتیک ها بر آبزیان انجام گردیده که نشان می دهد هر یک از این گروه ها اثرات معناداری را بر شاخص های مختلف، من جمله فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی خون، افزایش بازده غذا، بهبود عملکرد دستگاه گوارش با تاثیر بر فعالیت آنزیم های گوارشی و ساختار روده و بهبود پاسخ های ایمنی و در نتیجه افزایش مقاومت آبزی در برابر شرایط محیطی و غیره داشته است(۴۷، ۴۵، ۴۴، ۳۲، ۳۱، ۲۷، ۱۳، ۱۱). نظر به اهمیت ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان اصلی ترین گونه پرورشی ماهی در کشور و به دلیل تاثیر گذاری مستقیم پری بیوتیک‌ها بر جمعیت باکتریایی روده، در این مطالعه اثر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و قند مانان الیگوساکارید بر فاکتورهای رشد ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته و پس از ارزیابی فاکتورهای رشد، به بررسی و مطالعه آنزیم های گوارشی و ساختار بافتی روده ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداخته است.

مواد و روش ها

این مطالعه در یکی از مزارع پرورش ماهی سردابی حوالی شهرستان فیروزکوه استان تهران در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد که هر کدام دارای ۳ تکرار می باشد، انجام گرفت. علت انتخاب این نوع روش تحقیق به دلیل اجرای بخشی از پروژه در کارگاه و بخشی در آزمایشگاه می باشد، در این تحقیق از تانک های پلی اتیلن ۵۰۰ لیتری به تعداد ۱۸ عدد به عنوان واحدهای آزمایش استفاده شد. پس از ضدعفونی و شستشو، آب‌گیری با آب چاه با دمای۲ ± ۱۲درجه سانتی گراد و به میزان ۰/۵ لیتر بر ثانیه انجام گردید. تانک ها به طور تصادفی براساس تیمارها شماره گذاری شده و سپس همه ی بچه ماهیان بیومتری شده و به میانگین وزن ۲۸/۸ گرم و با تراکم ۱۵ عدد در هر تانک ذخیره سازی شدند. جهت انجام این تحقیق تعداد ۲۷۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۲۸/۸ گرم تهیه و ذخیره سازی گردیدند. به منظور سازگاری بچه ماهیان با محیط جدید عملیات آداپتاسیون به مدت ۲ هفته انجام گرفت. پس از پایان دوره سازگاری بچه ماهیان به مدت ۴۵ روز طبق طرح آزمایشی مورد تغذیه ویژه قرار گرفته و در پایان دوره آزمایش نمونه برداری شدند. به منظور تهیه جیره های آزمایشی، از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم(KC426951) ثبت شده در NCBI(۴۲) و قند مانان الیگوساکارید محصول شرکت بیورجین برزیل استفاده گردید. برحسب نوع جیره

آزمایشی سطوح مختلف پرمیکس پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک پس از توزین با ترازوی حساس آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم، با مقدار اندکی روغن ماهی و پلت های تغذیه به خوبی مخلوط و تا زمان استفاده، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جیره های آزمایشی به ترتیب حاوی، تیمار اول باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به میزان ۰/۳ گرم بر کیلوگرم غذا، تیمار دوم باکتری باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به میزان ۰/۵ گرم بر کیلوگرم غذا، تیمار سوم باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ۰/۳ گرم بر کلیوگرم غذا به همراه قند مانان الیگوساکارید به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم غذای جیره، تیمار چهارم باکتری مذکور به میزان ۰/۵ گرم بر کیلوگرم غذا به همراه قند مانان به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم غذای جیره، تیمار پنجم قند مانان به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم غذا و در نهایت تیمار ششم تیمار شاهد بوده و تنها از غذای پایه جیره غذایی و فاقد هر گونه مواد اضافی استفاده شد. در پایان دوره غذادهی جهت بررسی فاکتورهای رشد به صورت تصادفی ۱۵ قطعه ماهی از هر تانک برداشته و پس از اندازه گیری طول و وزن، ۱۰ قطعه ماهی به منظور تهیه بافت های معده و روده جهت بررسی آنزیم های گوارشی کالبد شکافی و بافت های مورد نظر جدا گردید. پس از شستشو با آب مقطر و وزن نمودن، بافت های مورد نظر بلافاصله فریز شده و با یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، بافت های تهیه شده با هموژنایزر و در مجاورت یخ یکنواخت شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۵۰۰۰ بر دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه عمل سانتریوفوژ انجام گردید. پس از پایان سانتریفیوژ مایع روئی به عنوان عصاره تام جهت بررسی آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت(۳۳). پروتئین عصاره نیز با روش برادفورد تعیین گردید(۸). فعالیت پروتئاز کل عصاره تام معده، روده و زوائد پیلوریک در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از هضم آزوکازئین و روش ارائه شده توسط Garcia-Carreno و Haard تعیین شد(۱۷). بدین منظور، ۵۰ میکرولیتر عصاره تام معدی با ۵۰۰ میکرولیتر آزوکازئین ۰/۵٪ در بافر تریس هیدروکلراید(۵۰ میلی مولار، pH ۷/۵) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس واکنش با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ متوقف گردید. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه و g ۱۴۶۰۰ سانتریوفوژ و میزان جذب در طول موج ۴۴۰ طی زمان ۳ دقیقه قرائت و ثبت شد. برای کنترل نیز تری کلرواستیک اسید قبل از افزودن سوبسترا به عصاره اضافه، سپس فعالیت پروتئازی کل از رابطه زیر محاسبه گردید(۳۳).

$$[Ab\,(supernatant) - Ab\,(control)/30\,min \times mg\,protein] \times 100$$

فعالیت تریپسین نیز در روده و pH ۷/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد محاسبه شد(۱۶). سوبسترای مورد استفاده نیز benzoyl-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) می باشد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر عصاره تام روده به ۱/۲۵ میلی لیتر بافر تریس هیدروکلراید ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۵ حاوی CaCl2 ۲۰ میلی مولار و BAPNA ۱ میلی مولار اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، واکنش با افزودن ۰/۲۵ میلی لیتر استیک اسید ۳۰٪ متوقف شده و میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه قرائت گردید(۳۳).

$$Ab\,(test/min) \times 1000 \times volume\,of\,reaction\,mixture/8800 \times mg\,protein\,in\,the\,mixture$$

بررسی آنزیم های آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون و به روش کالری متری انجام گردید.جهت بررسی هر یک از فاکتورهای رشد از روابط زیر استفاده گردید(۶):

افزایش وزن بدن: WG = FBW- IBW

ضریب رشد ویژه:

$SGR= 100\times(Ln FBW- LnIBW)/n$

فاکتور وضعیت: $CF= FBW/L3\times100$

وزن احشایی: $VSI=FBW/VW\times100$

درصد بقاء: $SR= N2/N1\times100$

که در آن:

IBW: وزن اولیه ماهی، FBW: وزن نهایی ماهی، n: دوره پرورش به روز، L: طول ماهی، VW: وزن احشا، N1: تعداد اولیه ماهی، N2: تعداد نهایی ماهی جهت بررسی ساختار روده ۵ قطعه ماهی از هر تانک در پایان دوره آزمایش به صورت تصادفی صید شده و نمونه-های مورد نظر جهت مطالعات بافتی و زیست- سنجی در محلول بوئن به مدت ۴۸ ساعت تثبیت و سپس برای نگهداری به الکل ۷۰ ٪ منتقل شدند. مراحل معمول بافت شناسی انجام و قالب های پارافینی به ضخامت شش میکرون برش داده شدند. در نهایت لام های تهیه شده به روش هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی گردید. در این روش به ترتیب خارج کردن پارافین موجود در مقاطع و آب‌دهی آن‌ها، قرار دادن اسلایدها در رنگ هماتوکسیلین به مدت ده دقیقه، گذراندن از آب مقطر و متعاقباً قرار دادن در محلول اسید هیدروکلریک ۱٪ و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، شستشو با جریان ملایم آب به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، قرار دادن در ظرف ائوزین به مدت یک دقیقه، عملیات آبگیری، شفاف سازی و چسباندن انجام گرفت، سپس نمونه های تهیه شده در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت(۴۳). تجزیه و تحلیل بر روی داده های مربوط به تغییرات فاکتورهای رشد، آنزیم های گوارشی و فاکتورهای روده ایی از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه-ای دانکن استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ با استفاده از نرم افزارSPSS(ورژن ۲۱) و Excel در محیط ویندوز انجام و مقادیر $P<۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

جدول ۱ نتایج بررسی فاکتورهای رشد در گروه-های پری بیوتیک، پروبیوتیک و سینبوتیک را نشان می‌دهد. این بررسی نشان داد تمامی گروه‌های آزمایشی به غیر تیمار پری بیوتیک در بررسی تغییرات وزن، طول، نرخ رشد ویژه و غیره از عملکرد بهتری نسبت به گروه شاهد برخوردارند. جدول ۲ تغییرات فعالیت آنزیم های آمیلاز، لیپاز، آلکالین فسفاتاز، پروتئاز و تریپسین را در پایان دوره آزمایش نشان می دهد. بر طبق جدول ۲، سنجش آمیلاز روده ایی در گروه های پروبیوتیک ۲ و سینبیوتیک ۱ و ۲ افزایش معناداری را در فعالیت آنزیم آمیلاز در قیاس با گروه شاهد نشان داد، در این بررسی بیشترین فعالیت مربوط به گروه پروبیوتیک ۲ بوده است. در حالی که در بررسی بافت پیلوریک افزایش معنادار فعالیت این آنزیم مربوط به گروه های آزمایشی پروبیوتیک ۱ و ۲ و سینبیوتیک ۲ بود. طبق جدول ۲، افزایش معنادار در فعالیت آنزیم لیپاز در گروه های سینبیوتیک ۲ و پروبیوتیک ۱ و ۲ در بررسی بافت های روده و پیلوریک ماهی قزل آلای رنگین کمان مشاهده گردید. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز روده ایی نیز نشان داد کلیه گروه‌های آزمایشی به جز گروه مانان الیگوساکارید نسبت به گروه شاهد افزایش معنادار دارند، در این مقایسه نتایج گروه های سینبوتیک در سنجش روده ایی بهتر از گروه های پروبیوتیکی بود، تمامی تیمارهای آزمایشی به جز گروه مانان الیگوساکارید در هر دو نمونه برداری نسبت به گروه شاهد افزایش معنادار در فعالیت آنزیم مذکور را در زوائد پیلوریک نشان دادند، جدول(۲). بررسی تغییرات فعالیت پروتئازی نیز افزایش معناداری را در کلیه گروه های آزمایشی به جز گروه

مانان در پایان دوره تغذیه نشان داد که در این بین بیشترین افزایش فعالیت آنزیمی مربوط به گروه سینبیوتیک ۲ در بررسی بافت زوائد پیلوریک بود. فعالیت آنزیم تریپسین نیز بهبود عملکرد این آنزیم را در کلیه گروه های آزمایشی بجز گروه مانان الیگوساکارید نشان داد(جدول ۲). به منظور بررسی تغییرات ساختار روده در پاسخ به استفاده از پری-بیوتیک، پروبیوتیک و سینبیوتیک مورد آزمایش، شاخص های ارتفاع پرزهای روده، ضخامت پرز، ضخامت لایه عضلانی و ضخامت لایه پوششی با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت، به رغم بهبود معنادار پارامترهای رشد ماهی، هیچ یک از گروه‌های تیماری تغییرات معناداری را در ارزیابی ساختار بافتی روده گونه هدف نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۱- فاکتورهای رشد در ماهی قزل آلای رنگین کمان در گروه های تیماری پس از پایان دوره آزمایش

فاکتورهای رشد	سینبیوتیک ۲	سینبیوتیک ۱	پری بیوتیک	پروبیوتیک ۲	پروبیوتیک ۱	کنترل
وزن نهایی(گرم)	۶۲/۹ ±۰/۶[b]	۶۵/۶ ±۰/۹ [b]	۵۷/۸ ±۰/۶[a]	۶۴/۵ ±۰/۴ [b]	۶۳/۳ ± ۰/۸[b]	**۵۹/۲±۱/۲ [a]**
طول نهایی(میلی متر)	۱۷۷±۱/۶	۱۷۹±۱/۳	۱۷۳±۱/۲	۱۷۸±۱/۷	۱۷۸±۱/۲	**۱۷۵±۰/۸**
CF	۱/۱۳±۰/۱	۱/۱۴±۰/۱	۱/۱۴±۰/۱	۱/۱۴±۰/۱	۱/۱۲±۰/۱	**۱/۱۰±۰/۱**
VSI	۱۴/۱±۰/۹	۱۳/۶±۱/۱	۱۱/۱±۰/۴	۱۴/۳±۱/۱	۱۳/۹±۰/۶	**۱٤/۱±۰/۸**
SGR	۱/۷±۰/۱ [b]	۱/۸۳±۰/۲ [b]	۱/۵±۰/۱ [a]	۱/۷±۰/۱ [b]	۱/۷±۰/۱[b]	**۱/٦±۰/۱ [a]**
نرخ بقا (٪)	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	۹۶	۱۰۰	**۹٤**

جدول ۲-مقایسه فعالیت آنزیم های گوارشی بین گروه های تیماری در پایان دوره آزمایش (U.mg protein-1)

آنزیم	بافت	سینبیوتیک ۲	سینبیوتیک ۱	پری بیوتیک	پروبیوتیک ۲	پروبیوتیک ۱	کنترل
آمیلاز	روده	۳/۷±۰/۲ b	۳/۳±۰/۲ b	۰/۷ ±۰/۰۲ c	۳/۹±۰/۲ b	۱/۸±۰/۱ a	**۲±۰/۱a**
	پیلوریک	۴/۹±۰/۲ b	۱/۶±۰/۱ a	۰/۶±۰/۰۳ c	۴/۶ ±۰/۲b	۴ ±۰/۲ b	**۱/۹ ±۰/۱ a**
لیپاز	روده	۴/۱±۰/۲ b	۲/۳ ±۰/۱ a	۲/۵ ±۰/۱ a	۴/۷ ±۰/۳ c	۳/۶ ±۰/۲ b	**۲/٤ ±۰/۱a**
	پیلوریک	۵/۵ ±۰/۳b	۳ ±۰/۱a	۳/۱ ±۰/۱a	۵/۱ ±۰/۲ b	۵/۴ ±۰/۳ b	**۲/۷±۰/۱ a**
آلکالین فسفاتاز	روده	۰/۱۹±۰/۰۱ c	۰/۲۱±۰/۰۰۱ c	۰/۰۳±۰/۰۰۲ a	۰/۱۲±۰/۰۰۶ b	۰/۱±۰/۰۰۳ b	**a ۰/۰۱±۰/۰۰۱**
	پیلوریک	۰/۱۹±۰/۰۱c	۰/۲۶±۰/۰۲b	۰/۱۱±۰۰۶a	۰/۳±۰/۰۲b	۰/۲۷±۰/۰۲b	**۰/۰۹±۰/۰۰۵**
تریپسین	روده	۰/۳۹±۰/۰۳ b	۰/۳۵±۰/۰۲b	۰/۱۳±۰/۰۰۵ c	۰/۴±۰/۰۳ b	۰/۳۷±۰/۰۳ b	**۰/۲٤±۰/۰۱ a**
	پیلوریک	۰/۴۶ ±۰/۰۳ c	۰/۳۳±۰/۰۲b	۰/۱۵ ±۰/۰۱a	۰/۳۸±۰/۰۳ bc	۰/۴۲±۰/۰۳bc	**۰/۲±۰/۰۱ a**
پروتئاز	روده	۲/۴±۰/۲ bc	۳±۰/۲c	۰/۹±۰/۰۶a	۱/۹±۰/۱b	۲/۵±۰/۲ bc	**۰/٦ ±۰/۰۳a**
	پیلوریک	۴/۲±۰/۳d	۲/۹±۰/۲b	۳/۶±۰/۳c	۳/۶±۰/۳bd	۳±۰/۲b	**۱/۷±۰/۱a**
	معده	۰/۷۷±۰/۰۲ b	۰/۸±۰/۰۳b	۰/۶±۰/۰۱a	۰/۷۸ ±۰/۰۳ b	۰/۸۱±۰/۰۱b	**۰/۵۵±۰/۰۱ a**

جدول ۳-فاکتورهای ارزیابی ساختار بافتی روده در گروه های تیماری پس از پایان دوره آزمایش

فاکتورهای مورد ارزیابی	سینبیوتیک ۲	سینبیوتیک ۱	پری بیوتیک	پروبیوتیک ۲	پروبیوتیک ۱	کنترل
ارتفاع پرز(میکرومتر)	۹۷۰/۱۲±۳۲/۷	۱۰۱۱/۰۶±۴۸/۲	۱۰۴۸/۸۲±۵۲/۲	۹۹۸/۳±۳۷/۷	۱۰۰۷/۴±۴۸/۴	۱۱۷۸/۴۲±۵۸/۳
ضخامت پرز(میکرومتر)	۹۲/۰۸±۱۳/۲	۱۰۱/۱۱±۱۷/۳	۱۰۶/۵۴ ± ۱۲/۴	۸۴/۱۳±۱۱/۱	۹۸/۸۹±۱۲/۷	۱۱۶/۶۱±۱۶/۶
ضخامت لایه عضلانی(میکرومتر)	۶۷/۸۷±۷/۱	۷۲/۲۲±۷/۶	۸۰/۹۲±۸/۷	۶۱/۶۴±۵/۸	۵۵/۴۳±۶/۳	۶۹/۱۲±۸/۵
ارتفاع بافت پوششی(میکرومتر)	۹۸/۲۱±۹/۷	۱۱۹/۹۴±۲۰/۳	۱۱۷/۶۵±۱۶/۳	۱۱۱±۱۰/۴	۱۰۷/۱±۱۴/۹	۱۱۴/۴۳±۱۵/۹

بحث و نتیجه گیری

نظر به درک اهمیت نقش پروبیوتیک ها بر موجودات زنده و مطالعات گسترده سال های اخیر پژوهش حاضر به مطالعه تأثیر پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و نیز تأثیر ترکیبی آن با قند مانان الیگوساکارید بر فاکتورهای رشد و برخی فاکتورهای گوارشی ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداخته است. نتایج تحقیق حاضر در پایان دوره آزمایش نشان داد که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به تنهایی و یا همراه با پری بیوتیک مانان الیگوساکارید بر فاکتورهای ارزیابی شده به طور معناداری موثر می.باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار های ماهیان تغذیه شده از پروبیوتیک و سینبیوتیک به طور معناداری سبب بهبود پارامتر های رشد و کارایی تغذیه می شوند. تمامی فاکتورهای مورد ارزیابی در این راستا اعم از رشد طولی، رشد وزنی و نرخ رشده ویژه در تیمارهای پروبیوتیک و سین بیوتیک وضعیت مطلوب تری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. در خصوص تاثیر پروبیوتیک و سینبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بهبود رشد آبزیان تاکنون مطالعات خوبی انجام شده است، برای مثال Son و همکاران با بررسی لاکتوباسیلوس پلانتاروم نشان دادند این گونه باکتریایی موجب افزایش رشد بر ماهی هامور می شود(۴۵). همین‌طور Giri و همکاران نتایج مشابهی را از این گونه پروبیوتیک بر ماهی تیلاپیا به دست آورده است(۲۰). Leilie و همکاران نیز نتایج مثبتی از عملکرد پروبیوتیک باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی تیلاپیا گزارش کردند. ایشان با بررسی مقادیر گوناگونی از باکتری در جیره غذایی ماهی نشان دادند باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم سبب بهبود عملکرد رشد، کارایی تغذیه و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی در برابر سمیت با آلومینیوم می شود(۲۶). Geovany و همکاران نیز ثابت کردند افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی سبب افزایش اشتها و بازده رشد در گروه های تیمار شده می گردد(۱۹). El-Haroun گزارش می نماید مکمل پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی تیلاپیا و گربه ماهی می تواند تاثیرات مثبتی در رشد به همراه داشته باشد(۱۵). Al-Dohail و همکاران نشان دادند افزودن پروبیوتیک به جیره غذای موجب افزایش کیفیت جیره و راندمان غذا شده و سبب بهبود بازده رشد، نرخ رشد ویژه و کارایی مواد مغذی می گردد(۲). نتایج مشابهی توسط Suzer و همکاران(۴۷) بر گونه *sarus aurata*، Aly و همکاران(۳) در ماهی تیلاپیای آبی و Venkat و همکاران(۵۰) بر شاه میگوی آب شیرین گزارش شده است.در حقیقت بهبود فاکتورهای رشد در ماهی تغذیه شده از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم می تواند در نتیجه افزایش راندمان دستگاه گوارش و هضم و جذب بهتر مواد

غذایی باشد(۲۵). در تحقیق حاضر بهبود عملکرد سیستم گوارشی از دو سازوکار، مورد مطالعه واقع گردید. در سازوکار نخست اثرات پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک مورد مطالعه بر میزان فعالیت برخی از مهم‌ترین آنزیم های گوارشی مورد پژوهش قرار گرفته و در بررسی سازوکار دیگر، اثرات پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک مورد مطالعه بر تغییر سطوح جذب و ساختار بافتی روده ماهی قزل آلای رنگین کمان بوده است. نتایج این پژوهش در بررسی نخست نشان داد، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به تنهایی و یا همراه با پروبیوتیک مانان الیگوساکارید موجب بهبود فعالیت آنزیم های گوارشی می شود. طیف وسیعی از پژوهش ها در بررسی تأثیر پروبیوتیک و سینبیوتیک بر عملکرد سیستم گوارش انجام گرفته و نتایج مشابهی وجود داشته است که از آن جمله می توان به مطالعه Ziaei و همکاران بر فعالیت پروتئاز تام و شبیه سازی تولید آنزیم های داخلی پرداخته است، اشاره نمود(۵۵)، Dehaghani و همکاران با بررسی سینبیوتیک IMBO بر ماهی کپور معمولی نشان دادند، افزودن مکمل سینبیوتیک بر جیره غذایی موجب بهبود فاکتورهای رشد متعاقب افزایش فعالیت آنزیم های تریپسین و کیموتریپسین در ماهی کپور معمولی می گردد(۱۱). بهبود فعالیت آنزیم های گوارشی در زمان به کار گیری پروبیوتیک در جیره غذایی آبزیان در بسیاری از موارد وابسته به تجمع و افزایش جمعیت باکتریای مفید در دستگاه گوارش و اثر آنزیم های خارجی در گونه هدف است. این ترشحات خارجی(Exogenous enzymes) از آن‌جا که در محدوده وسیع‌تری از pH فعال بوده و عمر فعالیت بیشتری نسبت به آنزیم های داخلی(Endogenous enzymes) دارند می توانند هضم پذیری دستگاه گوارش را به طور چشمگیری افزایش و متعاقباً در بهبود رشد اثر معناداری داشته باشند. در مطالعه ای بر روی خرچنگ دراز آب شیرین، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم سبب افزایش فعالیت آنزیم های آمیلاز، پروتئاز و آلکالین فسفاتاز گردید(۴۹). Ayo و همکاران با بررسی پروبیوتیک های(*L. plantarum, L.brevis, P. pentosaceas*) نشان دادند، پروبیوتیک‌های مذور سبب بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی خون، افزایش قدرت ایمنی و افزایش فعالیت برخی آنزیم های گوارشی در ماهی *Clarias gariepinus* می‌شود(۴). Wang و همکاران نیز نشان دادند استفاده از باکتری *Bacilllus licheniformis* در جیره غذایی ماهی *Epinephelus coiodes* سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در گونه مورد نظر می‌گردد(۵۱). در بررسی سازوکار دیگر، ساختار بافتی روده در تیمارهای مختلف آزمایشی با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه واقع شد. در این بررسی تاثیر مکمل پروبیوتیک، پری بیوتیک و سینبیوتیک بر پارامتر های: ارتفاع پرزهای روده ای، ضخامت پرزها، ارتفاع لایه پوششی و ضخامت لایه عضلانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی افزایش معناداری را در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد در نمونه برداری های انجام شده نشان نداد. در ارتباط با ساختار بافت روده به رغم اهمیت این عضو در دستگاه گوارش و حتی سیستم ایمنی ماهی، تنها معدودی از مطالعات به

بررسی اهمیت و تأثیر پروبیوتیک ها بر آن پرداخته است. تاثیر بهبود ساختار بافتی روده به لحاظ ریخت شناسی در عملکرد دستگاه گوارش و متعاقبا افزایش رشد و ایمنی امری بدیهی است، در مطالعات آبزیان بلندی پرزهای روده و چین های مخاطی شاخص هایی برای توانایی جذب بشمار می روند. افزایش اندازه پرزها سبب افزایش سطح جذب روده ایی و در نهایت جذب بهتر مواد مغذی شده و بهبود رشد آبزی را تضمین می نماید(۲۱). Davood و همکاران با بررسی تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم نشان دادند که تیمار مطالعاتی به صورت معناداری سبب بهبود ساختار روده در نتیجه افزایش طول و ضخامت ریز پرزهای روده ای و متعاقباً بهبود فاکتور های رشد در ماهی تیلاپیا می شود(۱۰). اما در بررسی دیگری توسط Merrifield و همکاران اثر پروبیوتیکی باکتری‌های *B. subtilis*, *B. licheniformis* و *E. fascium* بر ریخت شناسی دستگاه گوارش ماهی قزل آلا، اثر معناداری را در فاکتورهای مورد بررسی نشان نداد(۲۹). Pararat و همکاران استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* را موثر در افزایش ارتفاع پرزهای روده ایی در ماهی تیلاپیای نیل دانسته اند(۳۴)، در حالی که قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با باکتری *Pediococcus acidilactici* تغییرات غیر معناداری را در اندازه پرزهای روده ایی نشان داد(۲۹). نتایج تحقیق حاضر هم‌چنین نشان داد افزودن مکمل پری بیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره غذای ماهی قزل آلا بدون حضور پروبیوتیک، اثرات معناداری را در بهبود پارامترهای رشد و عملکرد دستگاه گوارش به همراه نخواهد داشت. در خصوص تأثیر کاربرد مکمل پری بیوتیک مانان الیگوساکارید بر فاکتورهای رشد، ساختار روده و فعالیت آنزیم های گوارشی نتایج متفاوتی تاکنون گزارش گردیده است. برخی منابع به تاثیر مطلوب مانان بر عملکرد رشد و بازده غذا تاکید کرده اند. در مطالعه ای که توسط Nan و همکاران انجام گردید(۳۱)، نتایج مثبتی از کاربرد مانان الیگوساکارید هنگام تغذیه ماهی از آرد سویا به دست آمد، ایشان نشان دادند استفاده از مانان الیگوساکارید در جیره غذایی ماهی توربوت سبب بهبود عملکرد رشد و تغذیه و نیز کاهش اثرات منفی سویا در سلامت دستگاه گوارش از طریق افزایش فعالیت آنزیم های نوار مسواکی روده، ممانعت از دگرگونی ریزپرزها و چین خوردگی های گوارشی و تنظیم میکروبیوتای دستگاه گوارش می شود. مطالعات دیگری اثرات مطلوب پری بیوتیک مانان الیگوساکارید را بر رشد و عملکرد دستگاه گوارش آبزیان مختلف گزارش نموده اند که از آن جمله می توان به اشاره کرد و این در حالی است که برخی تحقیقات، مانان الیگوساکارید را در بهبود رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی موثر ندانسته اند(۴۸، ۳۹، ۳۰، ۲۸، ۲۲، ۵۴، ۴۶، ۲۴). عدم دریافت پاسخ مناسب تیمار پری بیوتیک در تحقیق حاضر می تواند به دلایل مختلفی نسبت داده شود(۵۳، ۴۱، ۳۸، ۳۶، ۳۵، ۲۲، ۱۳، ۱). از آن‌جاکه در تحقیق حاضر به دلیل عدم فضای کافی در توسعه تیمار پری بیوتیک تنها از دوز توصیه شده شرکت سازنده استفاده شده است، این امکان وجود دارد که دوز تعریف شده در بررسی فعالیت گوارشی گونه مورد آزمایش ما در

بازه بهینه نبوده لیکن برای سایر گونه های آبزی بهینه، اثرات مطلوبی را به همراه داشته باشد. از سویی دیگر برخی محقیقین معتقدند طول و وزن گونه مورد نظر نیز می تواند در معنادار بودن یا نبودن اثرات پری بیوتیک موثر باشد، Dimitroglou و همکاران نشان داد که بیان اثرات پری بیوتیک مانان الیگوساکارید در دو گروه وزنی مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان کاملاً متفاوت و تابعی از وزن گونه مورد نظر است(۱۳). هم-چنین به نظر می رسد به رغم عدم دریافت نتایج مطلوب گروه پری بیوتیک در بررسی فاکتورهای رشد، مانان در بهبود شاخص های دیگر از جمله فاکتورهای ایمنی موثر بوده باشد. همان گونه که در جدول (۱) مشخص است، بهترین نتایج درصد بقاء ماهیان در هر دو برداشت زمانی مختلف مربوط به تیمار پری بیوتیک بوده است. Li و همکاران نشان دادند مصرف ۵ میلی گرم بر گرم غذا از مانان به همراه اینولین سبب افزایش قابل توجه پاسخ های ایمنی، مقاومت در برابر پاتوژن ها و افزایش نرخ بقاء در میگوی وانامی می شود(۲۷)، Soares و همکاران نیز نتایج مشابهی را بر روی پاسخ-های ایمنی در ماهی پاکوی تغذیه شده با مانان الیگوساکارید همراه به بتاگلوکان به دست آوردند(۴۴). در مطالعه دیگری توسط Nguyen و همکاران که بر روی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم انجام گردیده بود مشخص گردید که تیمار مورد نظر سبب افزایش قابل توجه رشد و ایمنی با تاثیر بر بهبود فعالیت لایزوزیم و عملکرد فاگوسیتی دستگاه ایمنی در ماهی تیلاپیا می شود(۳۲). از آن جا که مطالعه حاضر از منظر دقیق تر معطوف به رشد و کارایی تغذیه قزل آلای رنگین کمان بوده است، این امکان وجود دارد که در صورت ارزیابی گروه پری بیوتیک بر شاخص های دیگر مثلاً در مطالعات بیوشیمیایی و یا ایمنی شناسی شاهد حصول نتایجی کاملاً متفاوت در این گروه آزمایشی بود. درجمع بندی، نتایج پژوهش حاضر مشاهده شده که استفاده از مکمل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان موجب بهبود رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی می شود، این نتایج هم‌چنین نشان داد استفاده ترکیبی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با قند مانان الیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان موجب عملکرد مناسب دستگاه گوارش ماهی در هضم و جذب مواد مغذی و در نتیجه بهبود رشد در گونه مورد نظر می شود، در مطالعه حاضر تأثیر معناداری از پری بیوتیک مانان(MOS) در بهبود رشد و عملکرد دستگاه گوارش از مقایسه گروه تیمار با کنترل مشاهده نگردید اما با توجه به نتایج مطلوب به دست آمده از این گروه بر نرخ بقاء و بازماندگی ماهی قزل آلای رنگین کمان، پیشنهاد می گردد تأثیر مکمل پری بیوتیک مانان در دوز به کار رفته از منظر ایمنی شناسی در پژوهش های بعدی مورد بررسی و مطالعه واقع گردد.

منابع

1.Akrami, R., Karimabadi, A., Mohammadzadeh H., Ahmadifar, E. (2010). Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, survival, body composition and salinity stress resistance in

Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry stage. J. Mar. Sci. Technol., 8;47-57.

2.Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliya-paiko, M. (2009). Effects of the probiotics, *Lactobacillus acidiphilus*, on the growth performance, hematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish fingerling. Aquaculture Research, 40; 1642-1652.

3.Aly, S. M., Ahmed, Y. A.-G., Ghareeb, A. A.-A., Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shell Fish Immunology, 25(1); 128-136.

4.Ayo Olalusi, CI., Mojekwu, T., Adeleke, TA., Bernard, E., Adejonwo, MO., Adeyemi, YB. (2014). Digestive enzymes assay and haematological profile of clarias gariepinus juveniles fed with probiotics supplemented diets. Plants and Agriculture Research, 1(4); 124-135.

5.Azevedo, R.V., J.C. Fosse-Filho, S.L., Pereira, D.R., Vidal-Júnior, M.V. (2016b). Prebiotic, probiotic and synbiotic to *Trichogaster leeri* larvae. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 68(3); 795-804.

6.Bekcan, S., Dogankaya, L., Cakirogullari, G. C. (2006). Growth and body composition of European catfish, *Silurus glanis* (L.)fed diets containing different percentages of protein. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 58; 137–142.

7.Bogut, I., Z. Milakovic, S. Brkic, Novoselic, D., Bukvic, Z. (2000). Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*). Vet. Med. Czech, 45; 107–109.

8.Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72; 248-254.

9.Burrel, C. (2001). Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water, growth rate and physiology of Atlantic salmon. Aquaculture, 8; 181-174.

10. Dawood, M,A,O., Magouz, F,I., Salem, M,F,I., Daim, H,A.A. (2019). Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression in GIFT by heat-killed Lactobacillus plantarum (L-137). Aquaculture, 505; 127-136.

11. Dehaghani, P. G., Baboli, M. J., Moghadam, A. T., Ziaei-Nejad, S., Pour-farhadi, M. (2015). Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of com- mon carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Czech Journal of Animal Science, 60; 224–232.

12. Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. America Soc AnimSci, 87; 3226–3234.

13. Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., 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*). Aquacult. 300; 182-188.

14. Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple ‘F’ tests. Biometrics.

15. El-Haroun, E.R., Goda, A.M.A-S., Chowdury, M.A.K. (2006). Effect of dietary probiotic biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile Tilapia. Aquaculture Research, 37; 1473-1480.

16. Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and propertion of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys, 95; 271-278.

17. Garcia-Carreno, F.L., Haard, N. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla(*Pleuroncodes planipes*) and

crayfish(*Pacifastacus astacus*) extract. J Food Biochem, 17; 97-113.

18. Genc, M.A., Yilmaz, E., Genc, E. (2006). Mannan-oligosaccharides added to the eating catfish(*Clarias gariepinus* (Burchell, 1822))growth, intestinal and liver histology effects. J. Fish Aquatic Sci., 23; 37-41.

19. Geovany, G.R., Luis, B.J., Shem, M. (2007). Probiotic activity of aeromonas media on the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) when challenged with Vibrio tubiashii. Aquaculture, 169; 111-120.

20. Giri, S.S., Sukumaram,V., Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VGS_3 improve the growth, immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and shellfish Immunology, 34(2); 660-666.

21. Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K.B., Badiola, I. (2014). *Bacillus cereus* var: toyol promotes growth, affects the histological organization and microbiota of intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. J. Anim.Sci., 91; 2766-2774.

22. Gultepe, N., Salnur, S., Hossu, B., Hisar, O. (2010). Dietary supplementation with Mannan oligosaccharides(MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream(*Sparus aurata*). Aquaculture Nutr, 17(5); 482-487.

23. Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2011). Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nons-pecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. Fish Shellfish Immunol., 31(2); 310-317.

24. Hoseinifar, S.H., Eshaghzadeh, H., Vahabzadeh, H., Mana, N.P. (2015). Modulation of growth performances, survival, digestive enzyme activities and intestinal microbiota in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae using short chain fructooligosaccharide. Aquacult. Res., doi: 10.1111/are. 12777.

25. Lemieux, H., Blier, P., Dutil, J.D. (1999). Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod(*Gadus morhua*)? Fish Physiology abd Biochemistry, 20; 293-303.

26. Leilie, Y., Zhai, Q., Zhu, J., Zhang, C,C., Li, T., Liu, X. (2017). Ecotoxicology and Environmental. Safety, 143; 307-314.

27. Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., Ding, F. (2018). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish and Shellfish Immunology, 76; 78-92

28. Mahious, A.S., Ollevier, F. (2005). Probiotics and prebiotics in aquaculture: review. 1st regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture. AAARC, pp. 17-26 (Urmia, Iran).

29. Merrifield, D.L., Harper, G.M., Dimitroglou, A., Ringo, E., Davies, S.J. (2010). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Aquac. Res, 41; 1268-1272.

30. Najdegerami, E.H., Ngoc-Tran, T., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon N. (2011). Effects of poly-β-hydroxybutyrate(PHB) on siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its GI tract microbial community. FEMS Microbiology Ecology, 79; 25–33.

31. Nan, B., Min, Gu., Xiaojie, Xu., Bingying, Xu., Ashild, K. (2017). Protective effects of mannan oligosaccharides on turbot Scophthalmus maximus suffering from soy enteropathy. Aquaculture, 476; 141-151.

32. Nguyen, N., Onoda, S., Khanh, T,V., Hai, P,D., Trung, N,T., Koshio, S. (2019). Evaluation of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 498; 371-379.

33. Nya, E.J., Austin, B. (2011). Dietary modulation of digestive enzymes by the administration of feed additives to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. Aquaculture Nutrition, 17; e459–e466.

34. Pararat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpompisit, A., Chansue, N. (2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia by *Lactobacillus rhamnosus*. Res. Vet. Sci., 91(3); 92-97.

35. Pryor, G.S., Royes, J.B., Chapman, F.A. and Miles, R.D. (2003). Mannan oligosaccharides in fish nutrition: Effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in gulf of mexico sturgeon. North America J. Aquacult, 65; 106-111.

36. Razeghi, M.M., Akrami, R., Ghobadi, S.H., Denji, K.A., Ezatrahimi, N., Gharaei, A. (2012). Effect of dietary mannan oligosaccharide(MOS) on growth performance, survival, body composition and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile(*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish Physiol. Biochem., 38; 829-835.

37. Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. Aquaculture, 268; 251–264.

38. Sado, R.J., Bicudo, A.J.D.A., Cyrino, J.E.P. (2008). Feeding dietary mannanoligosaccharid to juvenile nile tilapia(*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. J World Aquacult Soc., 39; 821-826.

39. Salze, G., E. McLean, Schwarz, M.H., Craig, S.R. (2008). Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture, 274(1); 148-152.

40. Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172; 63-92.

41. Schwarz, K.K., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Gaudezi, C., Lima, P.A.G. (2011). Mannanoligosaccharides in diets for tilapia larvae. Rev. Bras. Zootec., 40(12); 2634-2640.

42. Shenavar Masouleh, A. (2013). Characterization of *Lactic acid* bacteria in intestine of persian sturgeon(*Acipenser persicus*) fingelings and their efficiency on the growth performances and some immunophysiological variable. Thesis submitted for Degree of Ph.D. Faculty of Aquatic Animal Health Veterinary Medicine, University of Tehran .140 p.

43. Sinha, G.M., Chakrabarti, P. (1985). On topological characteristics of the mucosal surface in the buccopharynx and intestine of an Indian freshwater major carp, Catla catla: a light and scanning electron microscopic study. Zool. J. Biol. (Anat.), 113; 375–389.

44. Soares, M,P., Oliviera, F,C., Cardoso, I,L., Urbianty, E,C., Campos, C,m., Hisano, H. (2018). Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with Aeromonas hydrophila. Fish & Shellfish Immunology, 73; 133-140.

45. Son, V.M., Chang, C.C.,Wu, M.C., Gu, Y.K., Chiu, C.H. (2009). Dietaryadministration 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.

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

47. Suzer, C., Coban, D., Okan Kamaci, H., Saka, S., Firat, K., Otgucuoglu, O. (2008). *Lacto bacillus* Spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream(*Sparus aurata*) larvae: effect on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280; 140-145.

48. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J. (2007). Immune stimulation and improved infection resistance in european sea bass(*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immunol., 23; 969-981.

49. Valipour, A., Nedaei, S., Noori, A., Khanipour, A,A., Hoseinifar, S.H. (2019). Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow

clawed crayfish (Astacus leptodactylus, Eschscholtz). Aquaculture, 504; 121-130.

50. Venkat, H.K., Narottam, P.S., Jain, K.K. (2004). Effect of feeding *Lacto bacillus*-based probiotics on the gut micro flora, growth and survival of post larvae of *macrobrachium rosenberii*. Aquaculture research, 35; 501-507.

51. Wang, T., Cheng, Y., Chen, X., Liu, Z., Long, X. (2017),. Effects of small peptides, probiotics, prebiotics, and synbiotics on growth performance, digestive enzymes, and oxidative stress in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, juveniles reared in artificial seawater. Chin. J. Oceanol. Limno 35; 89–97.

52. Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture, 258; 470–478.

53. Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., Klesius, P.H. (2007). Immune response and resistance to stress and Edwardsiella ictaluri challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. J. World Aquaculture Soc., 38; 24 –35.

54. Yilmaz, E., Genc, MA., Genc, E. (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh., 59;182–188.

55. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus spp*. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fennero penaeus* indicus. Aquaculture, 252; 516–524.

Effects of *Lactobacillus plantarum* and Mannan Oligosaccharide on growth performance and some digestive factors in *Oncorhynchus mykiss*

M. H. Najafi Enferadi[1], **F. Mohammadizadeh[1]**, M. Soltani[2], A. Hooshang Bahri[1], N. Sheikhzadeh[3]
1.Department of Fisheries, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran. **fmohammadi13@gmail.com**
2.Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3.Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received:2019.2.10 **Accepted: 2019.22.12**

Abstract

Inroduction & Objective: Growth and immunity resistance of fish are the most important factors in aquaculture. therefore, many types of research in probiotics, prebiotics, and synbiotics for improving growth and immunity in fish have been studied in the last years.

Materials and Methods: In this study, effects of *Lactobacillus plantarum* and MOS on growth performance, digestive enzymes activity and intestine morphology of *Oncorhynchus mykiss* were studied. Juvenile rainbow trout (n=270) in 6 administration groups in 18 tanks were kept and fed with diets containing different doses (0.3 and 0.5 g kg-^{1} feed) of the probiotic, (2 g kg^{-1} feed) of prebiotic, (0.3+2 and 0.5+ 2g kg^{-1} feed of probiotic and prebiotic respectively) and a control group for 45 days.

Results: Results showed a positive effect on growth performance and digestive enzymes activity in probiotic (0.3 and 0.5 g kg^{-1} feed of probiotic) and synbiotic groups compared to the control group($p<0.05$).

Keywords: *Lactobacillus plantarum,*Mannan oligosaccharides,Growth,Digestive enzymes, *Oncorhynchus mykiss*..