

اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و

پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*)

نسیم‌سادات حسینی مدنی^{۱*}، نرگس مورکی^۲، سید امیرعلی انوار^۳، حامد منوچهری^۴، مهوش قربانی^۵

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر کاربرد گونه باکتریایی *Pediococcus acidilactici* (CNCM-MA18/5M, Lallemand, France) از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*) انجام شد. در این تحقیق ۱۲۰ عدد ماهی به ترتیب با میانگین وزن و طول اولیه 2.4 ± 0.2 گرم و 2.7 ± 0.2 سانتیمتر تهیه و به طور تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم رهاسازی شدند. پس از ۱۴ روز از دوره تطبیق، آکواریوم‌ها به چهار گروه هر کدام با سه تکرار تقسیم و ماهیان با چهار جیره آزمایشی ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس حاوی سطوح 10^7 ، 10^8 ، 10^9 و 10^{10} پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به مدت ۸۴ روز تغذیه گردیدند. در طول دوره ماهیان هر ۲۱ روز یکبار زینت‌سنجی شدند و شاخصهای رشد محاسبه گردیدند. پس از پایان دوره پرورش خون‌گیری از ماهیان انجام شد. نتایج نشان دادند که به طور کلی شاخصهای رشد تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است ($P < 0.05$) و ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک به طور معنی‌داری رشد بهتری نسبت به تیمارهای دیگر و شاهد داشتند. پارامترهای خونی شامل گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و گلبول سفید در گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد ($P < 0.05$). در مجموع این تحقیق پیشنهاد می‌کند ماهیان گرین ترور تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* از بازده رشد، میزان بقا و پارامترهای خونی مناسبی برخوردارند.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*، شاخص‌های رشد، پارامترهای خونی، ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*)

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۲

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی امروزه تبدیل به تجارتي منحصر به فرد در مقایسه با سایر عرصه‌های تجاری در صنعت آبی‌پروری شده است و از این جهت انجام پروژه‌های تحقیقاتی در این زمینه

بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بخشی از پروژه‌های تحقیقاتی که در این خصوص به اجرا در می‌آید، بر بهبود بازده رشد و کارایی جیره مصرفی تاکید دارد (۱۱). برای ارتقاء شاخص‌های رشد در یک بازه زمانی معین، میزان بقا و کارایی جیره مصرفی، کاربرد محرک‌های رشد و مکمل‌های غذایی می‌تواند سودمند باشد؛ گروه وسیعی از این مکمل‌ها پروبیوتیک‌ها «سویه میکروبی زنده که دارای تأثیرات سودمند بر روی میزبان از طریق تأثیر بر فلور میکروبی لوله گوارش و بهبود مصرف غذا، ارتقاء و واکنش میزبان در برابر بیماری‌ها و یا از طریق بهبود شرایط محیطی میزبان می‌باشند» هستند (۱۸).

گروه موثری از پروبیوتیک‌ها باکتری‌های اسید لاکتیک (*Lactic acid bacteria*) شامل: *Lactobacillus spp.*، *Enterococcus faecium*، *Carnobacterium spp.*، *Lactococcus* می‌باشند. که تحقیقات وسیعی بر روی اثر کاربرد آنان در جیره شده است (۹). طیفی از انواع باکتریوسین‌ها توسط سویه‌های

Pediococcus acidilactici شرح می‌شود (۶ و ۳). این باکتریوسین‌ها سبب مقاومت گونه‌های آبی‌زیان در برابر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زا می‌شوند (۱۰). کاربرد این گونه به عنوان مکمل پروبیوتیکی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۱۴ و ۱۳) گربه ماهی کانالی (۱۷)، تیلایپای نیل (۲۱) و میگوی *Litopenaeus stylirostris* (۸ و ۷) مورد ارزیابی قرار گرفته است، اما در خصوص ماهیان زینتی تاکنون پژوهشی

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران nasim_madani66@yahoo.com

۲- استادیار دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳- دانشکده آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بهداشت مواد غذایی، تهران، ایران.

۴- استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، بابل، ایران.

۵- دانشکده آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، تهران، ایران.

آکواریومی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کاربرد گونه باکتریایی *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، شاخص‌های تغذیه‌ای و فاکتورهای خونی ماهی زینتی گرین ترور و تعیین دز موثر آن می‌باشد.

مواد و روش کار

طراحی آزمایش

تعداد ۱۲۰ عدد ماهی گرین ترور به ترتیب با میانگین وزن و طول اولیه $3/93 \pm 0/20$ گرم و $4/73 \pm 0/20$ سانتیمتر همگی از یک والد تهیه و در قالب ۴ تیمار هرکدام با سه تکرار در ۱۲ عدد آکواریوم (هرکدام دارای ۱۰ عدد ماهی) با ابعاد $50 \times 30 \times 40$ به طور کاملاً تصادفی رهاسازی شدند. پس از گذشت ۱۴ روز به منظور تطابق تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی تهیه شده آغاز گردید. آب مورد استفاده برای پرورش ماهیان در طول دوره از نقطه نظر فاکتورهای دما، اکسیژن محلول، PH، نیتريت و سختی مورد پایش قرار گرفت و فاکتورهای فوق در قالب مقادیر میانگین در جدول (۱) ارائه شده است. برای حفظ کیفیت آب در طی دوره از فیلتر شنی استفاده شد و ۴ درصد حجم کل آب هر سه روز یکبار و در بعضی موارد هر دو روز یکبار تعویض گردید.

جدول ۱- دامنه تغییرات پارامترهای آب آکواریوم‌ها در طول دوره پرورش

فاکتور	pH	دما	اکسیژن محلول	نیتريت	سختی کل
مقدار	۶/۵-۷/۵	$27 \pm 1^{\circ}C$	۶/۵-۸ppm	$0/02 \text{ mg l}^{-1}$	$170 \pm 0/5 \text{ mg l}^{-1}$

در سه سطح مختلف شامل: تیمار یک: ماهیان تغذیه شده با 10^9 CFU/kg (T₁)، تیمار دو: ماهیان تغذیه شده با 10^8 CFU/kg (T₂)، تیمار سه: ماهیان تغذیه شده با 10^7 CFU/kg (T₃)، به عنوان مکمل به جیره پایه ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس اضافه گردید. گروه شاهد نیز ماهیان تغذیه شده با جیره پایه

انجام نشده است. پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین‌ها از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی نظیر آمیلاز و پروتاز و تولید مواد مغذی ضروری (ویتامین‌ها، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه) سبب افزایش میزان هضم و جذب مواد غذایی شده که این خود سبب بهبود شاخص‌های رشد، و بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌گردد (۱۱). بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک آبزیان را در نتیجه بهبود و ارتقاء فرمولاسیون جیره، علاوه بر شاخص‌های رشد می‌توان با فاکتورهای خونی نیز ردیابی نمود (۱۶). مطالعات مختلفی در مورد تاثیر پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی ماهیان صورت گرفته است، که از آن جمله می‌توان به بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپای نیل (۱۰) و مطالعه اثر بخشی پروبیوتیک باکتوسل در مقابله و مواجهه با باکتری عامل بیماری استریتوکوکوزیس (۱)، اثر پروبیوتیک *Bacillus subtilis* بر شاخص‌های خونی کپور هندی (۱۷) و پروبیوتیک پروتکسین بر شاخص‌های خونی ماهی اسکار (۱۱) اشاره نمود. با توجه به این حقیقت که منابع و اطلاعات کاربردی در رابطه با پارامترهای هماتولوژی به طور کلی در رابطه با ماهیان و به خصوص ماهیان زینتی کم می‌باشند، این بخش نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد (۱۱). گونه *Andinocara rivulatus* متعلق به خانواده Cichlidae ماهی زینتی پرطرفدار

ساخت جیره آزمایش

جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان با استفاده از نرم افزار Win Feed 2.8 و با استفاده از مواد اولیه به شرح جدول (۲) تهیه گردید؛ سپس پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (CNCM- MA 18/5 M, Lallemand, France)

غذایی پاشیده می‌شد. ماهیان متناسب با میزان اشتها روزانه حدود ۲/۵ درصد بیوماس دو مرتبه در روز (۹ صبح و ۶ بعد از ظهر) تغذیه شدند.

جیره‌های غذایی مورد نظر پس از آماده سازی برای حصول اطمینان از کیفیت و ترکیب تقریبی به آزمایشگاه منتقل شدند و میزان پروتئین با استفاده از روش کج‌لدال و چربی خام مطابق با روش سوکسله توسط دستورالعمل AOAC(1990) اندازه‌گیری گردید(۵). رطوبت، فیبر، خاکستر، کربوهیدرات نیز به روش استاندارد AOAC(1990) اندازه‌گیری شد(۵).

فاقد پروبیوتیک بودند. برای ساخت جیره پایه مواد اولیه آسیاب شده با یکدیگر به صورت همگن مخلوط شده و سپس مقداری از روغن و مقداری آب برای تهیه خمیر به مواد اضافه شد، خمیر تهیه شده به رشته‌های اکستروژن تبدیل و در آون با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت خشک شد و در نهایت به پلت‌هایی به قطر ۱/۵ میلی‌متر کوچک و در داخل کیسه‌های پلاستیک در یخچال نگهداری شدند. هر روز قبل از غذاهای به ماهیان پروبیوتیک مورد نظر در بخشی از روغن جیره حل شده و به طور یکنواخت بر روی وعده

جدول ۲- اجزای غذایی و آنالیز شیمیایی تقریبی جیره‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک بر حسب درصد.

تیمار	T ₁	T ₂	T ₃	C
مواد غذایی				
آرد ماهی	۲۶/۴۵	۲۶/۴۵	۲۶/۴۵	۲۶/۴۵
آرد مخمر	۲۲/۵۶	۲۲/۵۶	۲۲/۵۶	۲۲/۵۶
گلوتن گندم	۱۷/۰۴	۱۷/۰۴	۱۷/۰۴	۱۷/۰۴
روغن سویا	۱	۱	۱	۱
آرد گندم	۳	۳	۳	۳
لسیتین	۲	۲	۲	۲
دی کلسیم فسفات	۱۲/۹۵	۱۲/۹۵	۱۲/۹۵	۱۲/۹۵
افزودنی*	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
پروبیوتیک (g/kg)	۱	۰/۱	۰/۱	-
آنالیز شیمیایی:				
ماده خشک (درصد)	۹۴/۰۸	۹۴/۰۸	۹۴/۰۸	۹۴/۰۸
پروتئین خام	۴۰/۳۲	۴۰/۳۲	۴۰/۳۲	۴۰/۳۲
چربی خام	۵/۹۶	۵/۹۶	۵/۹۶	۵/۹۶
فیبر	۱/۶۰	۱/۶۰	۱/۶۰	۱/۶۰
خاکستر	۴/۵۶	۴/۵۶	۴/۵۶	۴/۵۶
کربوهیدرات	۷/۴۰	۷/۴۰	۷/۴۰	۷/۴۰
انرژی	۲۴۴/۵۲	۲۴۴/۵۲	۲۴۴/۵۲	۲۴۴/۵۲

*مواد افزودنی شامل: آستاگزانتین ۰/۰۴۹ درصد- فلفل قرمز ۲درصد- آنتی اکسیدان ۰/۰۷۶ درصد- هم بند ۱ درصد- مخلوط مواد معدنی ۱/۵ درصد- مخلوط مواد ویتامینی ۲ درصد- ال- کارنیتین ۱/۱۷۶ درصد- ضد قارچ ۰/۳۳درصد- متیونین ۱ درصد- لیزین ۱ درصد- سیوس گندم ۰/۵۳درصد- پودرسیر ۲/۳ درصد- کولین کلراید ۲ درصد.

ماهیان هر ۲۱ روز یکبار با توجه به رشد آنها و به منظور جلوگیری از وارد آمدن استرس برای اندازه گیری طول کل و وزن کل مورد بررسی قرار می‌گرفتند. برای محاسبه بازده

فرمول	پارامترهای رشد
WG = وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن بدن (WG)
$WG (\%) = \frac{[وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)]}{وزن اولیه (گرم)} \times 100$	درصد افزایش وزن بدن (%WG)
$SGR_w = \frac{[تعداد روزهای غذا دهی / لگاریتم وزن اولیه (گرم) - لگاریتم وزن نهایی (گرم)]}{\text{day}}$	ضریب رشد ویژه وزنی (SGR_w)
$FCR = \frac{\text{غذای مصرفی (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}}$	ضریب تبدیل غذایی (FCR)
$CF = [طول نهایی ماهیان در انتهای پرورش (سانتیمتر) \div \text{وزن نهایی ماهیان در انتهای پرورش (گرم)}]$	ضریب چاقی (CF)
$SR (\%) = 100 \times \frac{\text{تعداد ماهیان در وزن اولیه}}{\text{تعداد ماهیان در وزن نهایی}}$	درصد بقاء (SR)

هپارین ریخته شد. برای شمارش گلبول قرمز و سفید با استفاده از سمپلر و محلول رقیق کننده نات هریک خون را رقیق نموده و با استفاده از لام هموسیستمتر نئوبار اقدام به شمارش گلبول قرمز و سفید گردید (۱۱) برای اندازه گیری هموگلوبین از روش سیان مت هموگلوبین استفاده شد و میزان هماتوکریت از روش میکرو هماتوکریت محاسبه گردید (۱). برای اندازه گیری شاخصهای MCV، MCH، MCHC از فرمول‌های زیر استفاده شد (۱۱):

$$MCV (\mu m^3) = [HCT \div RBC(\text{million})] \times 10$$

$$MCH (\text{pg/cell}) = [Hb \div RBC(\text{million})] \times 10$$

$$MCHC (\text{g/dl}) = (Hb \div Hct) \times 100$$

یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون Post hoc LSD در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تکرارها استفاده گردید.

نتایج

بازده رشد، میزان بقاء و شاخص تغذیه

بررسی فاکتورهای خونی

در پایان دوره ۸۴ روزه پرورش، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۳ تا ۶ عدد از ماهیان هر تیمار پروبیوتیکی به طور تصادفی انتخاب و در اژنول (از مشتقات گل میخک) به میزان نیم میلی لیتر در یک لیتر آب بیهوش شدند (۱). سپس ماهیان را خشک کرده و با استفاده از اسکالپل، ساقه دمی آنها قطع گردید. ۲ سی‌سی خون به وسیله لوله موئینه هپارینه درون ویال‌های آغشته به ۲۵ میکرولیتر

آنالیز آماری

آنالیز آماری با ورود داده‌های حاصل از انجام بیومتری و آزمایش خون به صفحات گسترده اکسل آغاز گردید. در نرم افزار اکسل، میانگین داده‌ها محاسبه گردید و سپس به نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ منتقل شد تا از نظر وجود میزان اختلاف معنادار بین تیمارها بررسی شوند. با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One-Way ANOVA وجود

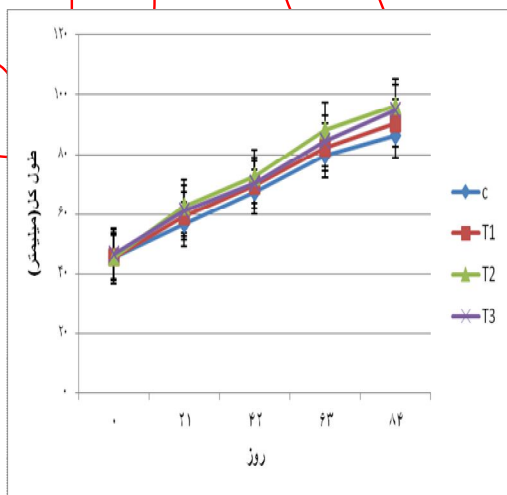
شاهد برخوردار بودند ($P < 0.05$) (نمودار ۱). همچنین با بررسی روند افزایش طول نیز مشخص شد که با وجود عدم تفاوت در طول اولیه پس از گذشت ۸۴ روز از تغذیه ماهیان در پایان دوره، اختلاف معنی‌داری در میزان طول کل ماهیان گروه‌های شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

در شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی به لحاظ وزن اولیه وجود نداشت ($P > 0.05$) (جدول ۳). اما به لحاظ وزن نهایی و میانگین افزایش وزن در چهار گروه مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید؛ به گونه‌ای که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^4 CFU/Kg پروبیوتیک از وزن بیشتری در مقایسه با دو تیمار دیگر و گروه

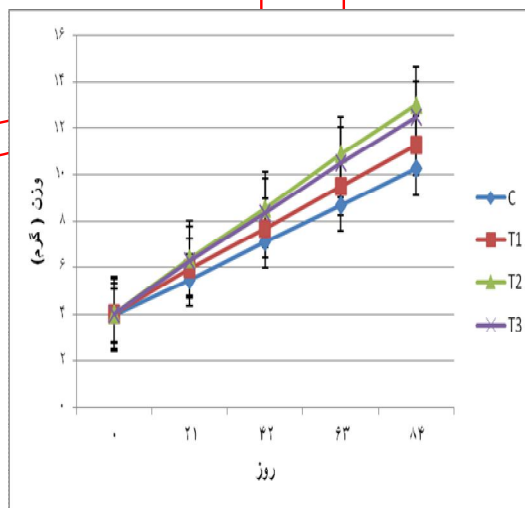
جدول ۳- مقایسه شاخص‌های رشد، تغذیه و درصد بقاء (میانگین \pm انحراف معیار) ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح متفاوت پروبیوتیک و گروه شاهد طی ۸۴ روز پرورش.

تیمار	T ₁	T ₂	T ₃	C
افزایش وزن (گرم)	۷/۲۶ \pm ۰/۳ ^c	۹/۰۳ \pm ۰/۲ ^a	۸/۴۹ \pm ۰/۵ ^b	۶/۳۲ \pm ۰/۵ ^d
درصد افزایش وزن بدن	۱۸۰/۰۵ \pm ۱۶/۸۳ ^c	۲۲۵/۷۵ \pm ۲۲/۳ ^a	۲۱۱/۷۲ \pm ۱۵/۳ ^b	۱۶۰/۸۱ \pm ۲۰/۲۴ ^d
افزایش طول (سانتیمتر)	۴/۵۱ \pm ۰/۷۳ ^c	۵/۰۵ \pm ۰/۵۳ ^a	۴/۸۲ \pm ۰/۶۴ ^b	۴/۰۶ \pm ۰/۷۶ ^d
ضریب رشد ویژه وزنی	۱/۲۳ \pm ۰/۱۱ ^c	۱/۴۱ \pm ۰/۱۷ ^a	۱/۳۳ \pm ۰/۱۲ ^b	۱/۱۴ \pm ۰/۱۰ ^d
فاکتور وضعیت	۱/۵۰ \pm ۰/۰۹ ^b	۱/۴۶ \pm ۰/۱۱ ^b	۱/۴۸ \pm ۰/۱۳ ^b	۱/۶۱ \pm ۰/۰۸ ^a
ضریب تبدیل غذایی	۲/۴۴ \pm ۰/۳۴ ^a	۱/۹۸ \pm ۰/۳۴ ^b	۲/۰۱ \pm ۰/۴۲ ^b	۲/۴۶ \pm ۰/۳۴ ^a
درصد بقاء	۷۳/۳ ^b	۹۳/۳ ^a	۹۳/۳ ^a	۹۰ ^a

*وجود حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).



نمودار ۲- روند تغییرات طول کل ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی ۸۴ روز پرورش.



نمودار ۱- روند تغییرات وزن ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی ۸۴ روز پرورش.

فاکتورهای خونی

فاکتورهای خونی محاسبه شده برای ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک در این تحقیق در جدول (۴) ارائه شده است. افزایش معنی داری در تعداد گلبول های قرمز ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک مشاهده شد ($P < 0/05$) و تعداد گلبول ها در این تیمار بیشتر از سایر گروه های مورد بررسی می باشد؛ پس از آن ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 CFU/kg پروبیوتیک بیشترین تعداد گلبول های قرمز را در نمونه خون خود داشتند که این دو گروه دارای اختلاف معنی داری ($P < 0/05$) در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/Kg پروبیوتیک و شاهد بودند. مقدار هموگلوبین به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 و 10^7 CFU/kg پروبیوتیک به طور معنی داری ($P < 0/05$) افزایش می یابد و پس از آن در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/Kg پروبیوتیک و شاهد به طور

معنی داری ($P < 0/05$) کاهش می یابد. بیشترین میزان هماتوکریت در T_2 مشاهده شد که با اختلاف معنی داری در تیمارهای مورد بررسی و گروه شاهد کاهش می یابد ($P < 0/05$). بیشترین میزان MCH در نمونه خون ماهیان شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها می باشد ($P < 0/05$); این شاخص به طور معنی داری در T_1 کاهش می یابد. بیشترین میزان MCV در ماهیان گروه شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود ($P < 0/05$) و کمترین میزان آن در ماهیان T_2 مشاهده شد. بیشترین مقدار شاخص MCHC در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک دیده شد و به طور معنی داری این شاخص در نمونه خون ماهیان T_1 کاهش یافت ($P < 0/05$). بیشترین تعداد گلبول های سفید در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک شمارش شد که دارای اختلاف معنی داری با سایر تیمارها می باشد ($P < 0/05$).

جدول ۴- مقایسه پارامترهای خون شناسی (میانگین \pm انحراف معیار) ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و شاهد طی ۸۴ روز پرورش

فاکتور	شمار	T_1	T_2	T_3	C
گلبول قرمز (تعداد در میلی متر مکعب $\times 10^6$)	$1/57 \pm 0/03^c$	$2/10 \pm 0/09^a$	$1/82 \pm 0/06^b$	$1/54 \pm 0/06^c$	
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	$4/36 \pm 0/09^c$	$6/80 \pm 0/05^a$	$6/10 \pm 0/09^a$	$5/64 \pm 0/09^b$	
هماتوکریت (درصد)	$16/20 \pm 1/82^c$	$20 \pm 0/97^a$	$18/02 \pm 1/2^b$	$17 \pm 1/41^c$	
MCH (پیکوگرم)	$27/77 \pm 0/08^c$	$32/38 \pm 1/13^b$	$33/52 \pm 0/09^b$	$37/62 \pm 0/91^a$	
MCHC (گرم در دسی لیتر)	$26/91 \pm 0/91^b$	$34/0 \pm 0/91^a$	$33/85 \pm 0/91^a$	$33/18 \pm 0/58^a$	
MCV (فمتولیترا)	$103/18 \pm 0/19^b$	$95/24 \pm 1/01^d$	$99/01 \pm 1/21^c$	$110/39 \pm 0/91^a$	
گلبول سفید (تعداد در میلیمتر مکعب $\times 10^3$)	$14/50 \pm 0/25^c$	$27/10 \pm 0/92^a$	$17/86 \pm 0/53^b$	$16/71 \pm 0/46^b$	

*وجود حروف متفاوت نشانه وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0/05$).

بحث

شاخص های رشد، بقاء و تغذیه

مطالعات متعددی در سال های اخیر نقش مفید پروبیوتیک ها در تغذیه و همچنین تاثیر حفاظتی آنها در برابر عوامل پاتوژن را

مشخص نموده اند (۲۰). اثر سویه *Pediococcus acidilactici* برای طیفی از انواع آبزیان شامل ماهی قزل آلائی رنگین کمان (۱۳، ۱۴ و ۱۵) گربه ماهی کانالی (۱۷) و میگوی *Litopenaeus stylirostris* (۸ و ۷) مورد ارزیابی قرار گرفته

است، اما در خصوص ماهیان زینتی گزارشی در دست نیست (۱۱). همچنین مشخص شده است که این گونه باکتریایی سبب افزایش رشد لارو ماهی توربوت (*Psetta maxima*) نیز می‌گردد (۱۹). در تحقیق حاضر افزودن پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به عنوان گونه ای از باکتری های اسید لاکتیک به جیره غذایی ماهی گرین ترور منجر به افزایش رشد آنها در مقایسه با گروه شاهد گردید که این تفاوت معنی دار بود.

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی که بر روی ماهی تیلاپای نر *Oreochromis niloticus* با میانگین وزنی ۱۷۵ گرم به مدت ۳۲ روز انجام دادند، عملکرد رشد بهتری را در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند، هر چند این تفاوت معنی دار نبود (۱۰)، اما مطالعات دیگری در ارزیابی اثر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر عملکرد رشد و استفاده از مواد مغذی نتایج متناقضی را گزارش کردند (۲۱ و ۱۷).

Anderson در سال ۲۰۱۳ در بررسی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر فلور میکروبی ماهی قزل آلا با میانگین وزنی ۳۱۰ گرم به مدت ۴ هفته تفاوت معنی داری را در رشد این ماهی مشاهده کرد (۴).

Firouzbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز افزایش رشد معنی داری را بر روی پارامترهای رشد ماهی زینتی اسکار تغذیه شده با پروبیوتیک پروتکسین مشاهده کردند (۱۱)، همچنین در تحقیقی که توسط Zhou و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت افزایش رشد معنی داری در ماهی تیلاپای نیل زمانی که پروبیوتیک به آب محیط پرورش اضافه می‌شود گزارش گردید (۲۱). تفاوت در این نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه میزبان و گونه پروبیوتیک و طریقه در اختیار قرار گرفتن پروبیوتیک توسط پرورش دهنده باشد (۱۲). با این حال افزایش رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی

۱۰^۸ CFU/Kg پروبیوتیک در تحقیق حاضر نسبت به سایر تیمارها مشهودتر بود، علت این امر می‌تواند به دلیل تاثیر پروبیوتیک در بهبود فلور طبیعی روده باشد که با ترش آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز، لیپاز و پروتئاز باعث تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی و بهبود تغذیه میزبان می‌شوند (۱۱). در نتیجه با افزایش قابلیت هضم و افزایش جذب غذای بلعیده شده، کارایی تغذیه را افزایش داده که منجر به افزایش رشد ماهیان می‌گردد (۹ و ۱۱). بنابراین، افزایش قابلیت هضم همراه با ویژگی های آنتی باکتریایی پروبیوتیک ها باعث افزایش وزن و بقای ماهیان می‌گردد (۱۱). همچنین علت کاهش رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰^۹ CFU/kg پروبیوتیک در تحقیق حاضر می‌تواند به این دلیل باشد که استفاده بیش از حد از پروبیوتیکها منجر به تداخل در متابولیسم طبیعی بدن و در نتیجه کاهش رشد در ماهیان این گروه نسبت به سایر تیمارها باشد که البته این مورد نیازمند بررسی بیشتر می‌باشد.

در مطالعه حاضر میزان FCR در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰^۸ CFU/kg پروبیوتیک نسبت به تیمارهای T و گروه شاهد کاهش معنی داری نشان داد. میزان SGR نیز در ماهیان تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. نتایج مشابهی در استفاده از پروبیوتیک در افزایش نرخ رشد ویژه وزنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد به دست آمده است، از جمله کاهش معنی داری را در ضریب تبدیل غذایی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با *Bacillus sp.* مشاهده کردند (۲۰). Castex و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی رژیم غذایی میگوی بالغ *Litopenaeus stylirostris* که با جیره حاوی ۱۰^۶ CFU/g و ۱۰^۷ پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* تغذیه شده بود، مشاهده کردند که ضریب تبدیل غذایی در انتهای آزمایش نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری کاهش یافته است (۸). در تحقیق انجام گرفته توسط

رشد بهتر نمی باشد (۱۱). فاکتور وضعیت در ماهیان گرین ترور تغذیه شده به نسبت گروه شاهد کمتر و این تفاوت بین تیمارهای دو و سه با گروه شاهد معنی دار بود.

با وجود آنکه اغلب مطالعات مرتبط از غلظت‌های مختلف پروبیوتیک‌ها استفاده نموده‌اند، اما هنوز هم نسبت و غلظت بهینه آنها به روشنی و قابل تعمیم به سایر موارد بیان نشده است و نیاز به تحقیقات فیلدی فراوان می باشد (۱۱). همچنین غلظت‌های مورد نیاز پروبیوتیک‌ها به منظور ایجاد اثرات القایی مناسب و جلوگیری از بروز بیماری‌ها در گونه‌های مختلف آبزیان در شرایط مختلف مانند نوع جیره غذایی، شدت تغذیه، طول دوره پرورش، نوع پروبیوتیک و مقدار آن، نوع گونه پرورشی و فاکتورهای محیطی، استرس و غیره متفاوت بوده و سؤالات متعددی در این مورد وجود دارد (۹). به طور عمده، تعیین اینکه آیا به طور واقعی پروبیوتیک‌ها تأثیر مثبتی روی طعم غذا داشته و تغییری را در بهبود قابلیت هضم غذا ایجاد می نمایند نیز بسیار مهم می باشد (۲۰ و ۹)، که می تواند از اهداف تحقیق در آینده باشد.

پارامترهای خونی

مطالعات صورت گرفته بر روی گونه‌های مختلف ماهی موید این مطلب می باشد که بسیاری از پارامترهای خون شناسی در ماهی نیز همانند پستانداران تحت تأثیر مجموعه‌ای از عوامل محیطی و بیولوژیک مانند سن، جنس، تولید مثل، طول و وزن ماهی و عوامل بیماری‌زا دستخوش تغییر و دگرگونی می گردد (۱۱ و ۲). تأثیر تغذیه و مواد افزودنی غذایی بر روی فاکتورهای خونی در بعضی مطالعات مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۵ و ۱۱). در این مطالعه آنالیز هماتولوژی ماهیان گرین ترور تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک *P. acidilactici* نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک افزایش بیشتری در تعداد کل WBC داشتند که نسبت به تیمارهای دیگر پروبیوتیکی و شاهد معنی دار بود.

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی ماهی تیلاپیای نیل نر تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 CFU/g پروبیوتیک CNCM MA18/5M, Bactocell (Lallemand Inc.,) *Pediococcus acidilactici* (Canada صورت گرفت عدم وجود اختلاف معنی داری در میزان FCR و SGR گروه شاهد با گروه تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده کردند (۱۰).، همچنین در تحقیق صورت گرفته توسط Merrifield و همکاران در سال (۲۰۱۱) که بر روی تغذیه ماهی قزل آلی رنگین کمان با میانگین وزنی ۹ گرم با جیره پایه حاوی *P. acidilactici* به مدت ۶ هفته صورت گرفته بود تفاوت معنی داری در نرخ رشد ویژه مشاهده نشد (۱۵). دلیل تفاوت‌ها در این نتایج می تواند به علت تفاوت در نوع گونه پرورشی، اندازه و سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آنها، فرمولاسیون جیره، رفتارهای تغذیه ای، نوع پروبیوتیک مصرفی و میزان مورد استفاده آن در جیره باشد (۱۲ و ۱۰). افزایش قابل توجه عملکرد و ماندگاری یا دوام ماهیان به دلیل افزودن پروبیوتیک‌ها به غذا می تواند به دلیل کشتن باکتری‌های مضر توسط باکتری‌های پروبیوتیک یا ترشح ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها که مانع از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها می گردد باشد (۱۱)؛ تحقیقات صورت گرفته توسط آذری و حقیقی در سال ۱۳۹۰ در خصوص مقاومت ماهی قزل آلی رنگین کمان در مقابله و مواجهه با استرپتوکوکوزیس نیز در ادامه و تکمیل همین موضوع و جهت آزمایشات فیلدی و ثبت داروئی این محصول در کشور ایران بوده است (۱). در تحقیق حاضر ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 10^9 CFU/kg پروبیوتیک کمترین میزان بقا را دارا بود، بنابراین می توان نتیجه گرفت غلظت زیاد پروبیوتیک‌ها همیشه نشان دهنده ماندگاری و

گرفته توسط Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی تیلایپای تغذیه شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* می‌باشد (۱۰). Ferguson و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان می‌کنند که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* تفاوت معنی‌داری در سطح هموگلوبین و گلبول قرمز ایجاد نمی‌کند اما کاهش معنی‌داری در سطح هماتوکریت را سبب می‌شود که دلیل آن مشخص نمی‌باشد (۱۰). تمایز شدید تعداد کل RBC در ماهیان غذایی شده با جیره حاوی 10^8 CFU/kg پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد، سبب نرخ بالای متابولیسم ناشی از استفاده از پروبیوتیک‌ها و به دنبال آن افزایش نیاز اکسیژنی گردید. بنابراین، افزایش در تعداد RBC و افزایش تراکم هموگلوبین در نهایت منجر به افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در ماهیان غذایی شده با جیره حاوی پروبیوتیک گردید. همچنین چنین ماهیانی قادر به تأمین بیشتر اکسیژن برای بافت‌ها در مواقعی می‌باشند که نیاز اکسیژنی بالاتر می‌رود (۱۱). در تحقیق حاضر با توجه به بارز بودن شاخص‌های گفته شده در ماهیان تغذیه شده با 10^8 CFU/Kg می‌توان چنین برداشت کرد که این ماهیان از وضعیت جسمانی خوبی برخوردار بودند. از این مطالعه می‌توان این گونه نتیجه گرفت که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* سبب بهبود پارامترهای خون شناسی شامل افزایش تعداد گلبول قرمز، سفید، هماتوکریت و هموگلوبین می‌گردد. ضمناً در نتیجه آزمایش مشخص شد که افزودن این پروبیوتیک به میزان 10^8 CFU/kg به جیره غذایی، اثر مناسبی در افزایش فاکتورهای وزنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارهای مورد مطالعه دارد.

افزایش تعداد گلبول‌های سفید در ماهی تیلایپای نیل تغذیه شده با جیره حاوی 10^8 CFU/g از این پروبیوتیک (۱۰)، در ماهی زیتنی اسکار با نام علمی (*Astronotus ocellatus*) تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک پروتکسین (۱۱) و در کپور هندی با نام علمی (*Labeo rohita*) که با مکمل پروبیوتیک *Bacillus subtilis* تغذیه شده بودند نیز مشاهده گردید (۱۶). افزایش تعداد WBC می‌تواند به عنوان یک واکنش سیستم ایمنی غیراختصاصی مطرح باشد که ناشی از مصرف پروبیوتیک‌ها است در نتیجه انتظار می‌رود که این ماهیان دارای مقاومت بیشتری در برابر عوامل استرس‌زا و بیماری‌ها باشند که البته این مورد نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد (۱۶ و ۱۱). در تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌داری در مقادیر حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در ماهیان گرین ترور تغذیه شده با سطوح متفاوت پروبیوتیک و گروه شاهد دیده شد که مشابه با تحقیقات صورت گرفته توسط Firouzbaksh و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ماهی اسکار تغذیه شده با مکمل پروتکسین می‌باشد (۱۱). مطالعه شاخص‌های گفته شده می‌تواند در تشخیص انواع کم‌خونی‌ها و فقر آهن مفید باشند (۲). پایین بودن مقدار MCV می‌تواند به عنوان یک پارامتر خونی مثبت باشد زیرا با کوچک شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آنها در رگ‌های خونی آسانتر و سریعتر می‌گردد و از ایجاد لخته جلوگیری می‌کند (۱۰ و ۱۱). همچنین میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین در این آزمایش در ماهیان تیمارهای T_2 و T_3 تغذیه شده با این پروبیوتیک افزایش پیدا کردند که متفاوت با تحقیقات انجام

fish, Aquaculture review. J. Intern. Aquatic Res. 1: 1-29.

10- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Blacazar, J.L., S. J.L., Davies, S.J. (2010): The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jour. App. Microbio. 109(3): 851-862.

11- Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K., Jani-Khalili, K. (2011): Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. J. Fish Physiol. Biochem. 37: 833-842.

12- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. (2000): The use selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. J. Aqua. 191(1-3): 259-270.

13- Merrifield, D.L., Guroy, D., Guroy, B., Emery, M.J., Liewellyn, C.A., Skill, S., Davies, S.J. (2010a): Assessment of Chlorogloepsis as a novel microbial dietary supplement for red tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Aqua. 299(1-4):128-133.

14- Merrifield, D.L., Harper, G., Dimitroglou, A., Ringø, E. and Davies, S.J. (2010b): Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Jour. Aqua. Res. 41(8): 1268-1272 .

15- Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B. and Davies, S.J. (2011): Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). J. Aqua. Nut. 17: 73-79.

16- Nayak, S.K., Swain, P., Mukherjee, S.C. (2007): Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). J. Fish. Shelfish Immu. 23(4): 892-896.

فهرست منابع

۱- آذری تاکامی، ق.، حقیقی، ع.، بهمنش، ش. (۱۳۹۰): بررسی مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف باکتوسل در مواجهه با بیماری استریتوکوکوزیس، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور.

۲- حقیقی، م. (۱۳۸۸): روشهای آزمایشگاهی خون شناسی ماهی، چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات، تهران، ایران: ۲۳-۱۸، ۴۲-۲۹.

3- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., Koidis. P. (2008): Pediocin SA-1 an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. Jour. Bior. Tech. 99(13):5384-5390.

4- Anderson, A. (2013): The effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* on the gut micribiota ecology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*Walbaum). J. Plymouth. Stud. Sci. 6(1): 86-103.

5- Williams, S. (1990): Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC) 15th edn, Virginia. P: 1298.

6- Bhunia, A. K., Johnson, M.C., Ray, B., Belden, E. L. (1990): Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pedicoccus acidilactici*. Jour. App. Bact. 69(2): 211-215.

7- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J. L., Schmidely, P., Mariojous, C. (2008): Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Jour. Aquaculture. 275(1-4): 182-193.

8- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2009): Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. J. Aqua. 294(3-4): 306-313.

9- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. (2009): Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in fin

- 17- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Klesius, P. H. (2007): Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and diseases resistance in young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), J. App. Aqua. 19: 81-91.
- 18- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000): Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Jour. Microb. Molec. Bio. Rev. 64(4): 655-671.
- 19- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. (2010): *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. J. Aqua. 307(1-2):83-88.
- 20- Yanbo, W., Zhirong, X. (2006): Effect of probiotic for common carp (*Cyprinu carpio*) based on growth performance and digestive enzymes activities. J. Ani. feed sci. Tech. 127(3-4): 283-292.
- 21- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W. (2010): Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. J. Fish Physiol. Bio. 36(3): 501-509.

JCP

JCP