بررسی اثر ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با آلژینات/کیتوزان بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*)

- **مصطفی قلی‌پور**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **سیاوش سلطانیان***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **مصطفی اخلاقی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **مجتبی علیشاهی**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مریم میربخش**: مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **حمیدرضا قیصری**: گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۸

چکیده

استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌دلیل اثرات مفید در سلامت ماهی رشد فزاینده‌ای داشته است. یکی از مشکلات اصلی استفاده از پروبیوتیک‌ها غیرفعال شدن آن‌ها در شرایط معده‌ای - روده‌ای ماهی است. محافظت پروبیوتیک‌ها با ریزذرات زیست تخریب پذیر توان پروبیوتیکی آن‌ها را بهبود می‌بخشد. لذا در این تحقیق اثر ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) با نانوذرات آلژینات/کیتوزان بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی باس دریایی جوان *Lates cadalifer* ارزیابی شد. بدین‌منظور تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی باس دریایی با میانگین وزنی ۲/۸±۳۷/۲ گرم به چهار تیمار در سه تکرار به‌صورت زیر تقسیم شدند: تیمار T1 با خوراک حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بدون پوشش، T2 با خوراک حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده T3 با خوراک حاوی آلژینات/کیتوزان و گروه شاهد با خوراک پایه تغذیه شدند. ماهیان به‌مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. نمونه‌گیری از ماهی‌ها در روزهای ۳۰ و ۶۰ تحقیق انجام گرفت و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های رشد مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مرحله اول تحقیق نشان داد بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند آلفا آمیلاز و فسفاتاز قلیایی در تیمار تغذیه شده با آلژینات/کیتوزان و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده در روزهای ۳۰ و ۶۰ وجود دارد، اما بیش‌ترین میزان عملکرد رشد در تیمار تغذیه شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده در روز ۶۰ مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد ریزپوشانی باکتری با نانوذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را بهبود بخشد ($p<0/05$) و توانست عملکرد مثبت پروبیوتیکی را در رشد ماهی باس دریایی بهبود بخشد هرچند این نتایج با نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی هم‌خوانی نداشت.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، کیتوزان/آلژینات، آنزیم‌های گوارشی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: siyavashsoltanian@yahoo.com

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

مقدمه

توسعه فعالیت آبزی‌پروری دریایی در کشور به‌ویژه ماهیان دریایی در جنوب کشور از اهداف سازمان شیلات و دولت بوده که برنامه‌ریزی، جهت تولید ۲۰۰ هزار تن ماهی به‌روش پرورش در قفس در برنامه ششم توسعه هدف گذاری شده است. به‌همین دلیل در حال حاضر گونه‌های مختلفی از ماهیان دریایی جهت پرورش در سیستم پرورش در قفس در کشور معرفی شده‌اند که از بین آن‌ها ماهی باس دریایی آسیایی (Asian Seabass) به‌علت ویژگی‌های بهتری که در شرایط پرورش دارد در استان‌های جنوبی کشور در قفس و استخر خاکی پرورش می‌شود. ماهی باس دریایی آسیایی با نام علمی *Lates calcarifer* و نام عمومی بارامونده (Barramundi) در استرالیا گونه‌ای با قابلیت تحمل دامنه وسیعی از شوری (ppt۰ تا ۵۵) است که در بین ماهیان دریایی پرورشی دارای رشد سریع بوده و در طی کم‌تر از ۸ ماه از مرحله انگشت‌قد (۲۰ گرم) به رشد وزنی بیش از ۷۰۰-۶۰۰ گرم می‌رسد. هم‌اکنون مهم‌ترین کشورهای پرورش‌دهنده این گونه، استرالیا، تایلند، تایوان، اندونزی، مالزی، سنگاپور و عربستان سعودی هستند. علی‌رغم این‌که این گونه ماهی رشد مناسبی در شرایط پرورش دارد، اما بیماری‌های باکتریایی چالش بزرگ پیش‌روی توسعه آبزی‌پروری این گونه در بیش‌تر کشورهای پیشگام پرورش آن بوده است که به‌عنوان یک هشدار برای پرورش‌دهندگان و برنامه‌ریزان شیلاتی در کشور است. بیماری‌های با میزان شیوع و تلفات بالا، منجر به خسارات اقتصادی شدیدی در مزارع پرورش ماهی می‌گردند. این زیان‌های اقتصادی تأثیر سوئی نه تنها در مزارع پرورش ماهی، بلکه در اقتصاد کشورهای صاحب این صنعت نیز می‌گذارند. کاهش هزینه‌های پرورش از طریق بهبود جیره‌های غذایی و نیز افزایش مقاومت آبزیان پرورشی در برابر شرایط استرس‌زای پرورش و بیماری‌ها، یکی از موارد مهم در بالابردن کارایی تولید ماهی می‌باشد. یکی از مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری همواره در کنار رشد قابل توجه خود با آن مواجه بوده، شیوع بیماری‌ها است که گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است (FAO، ۲۰۱۰). همواره راه‌حل‌هایی برای حل این مشکلات ارائه گردیده که موفقیت چندانی را در پی نداشته‌اند. استفاده از پروبیوتیک به‌عنوان مکمل غذایی برای حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد (Fuller، ۱۹۸۹). در حال حاضر بسیاری از بخش‌های صنعت آبزیان شروع به کاهش استفاده و وابستگی خود به داروهای ضدمیکروبی کرده‌اند. پیشرفت در تولید واکسن، محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک (ساختار این مواد استفاده از باکتری‌های مفید و آنزیم آن‌ها می‌باشد) در آینده‌ای نزدیک جای درمان دارویی را خواهد گرفت. در روند پرورش ماهیان باس دریایی اثر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌اثبات رسیده است (Ashori، ۲۰۱۸). توسعه غذاهایی که سبب بهبود وضعیت عملکرد رشد و در نتیجه تأمین سلامت ماهی می‌شوند، یکی از فاکتورهای مهم اولویت تحقیقاتی در بحث آبزی‌پروری می‌باشد، به‌طوری‌که امروزه غذاهای غنی‌شده با ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند پروبیوتیک و پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک‌ها برتری مصرف دارند. استفاده از پروبیوتیک‌ها برای بهبود وضعیت متابولیکی، شاخص‌های رشد و وضعیت فعالیت آنزیم گوارشی روده موجودات بسیار قابل‌توجه است (Kullisar و همکاران، ۲۰۰۳). پروبیوتیک‌ها به دلیل حساسیت به شرایط مختلف نظیر دمای بالا، شرایط اسیدی، نمک‌های صفراوی موجود در دستگاه گوارش، باکتریوفاژها، مواد مضر آنتی‌بیوتیکی نیاز به روش‌هایی برای افزایش قابلیت زیستی دارند تا بتوانند به تعداد کافی توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوییدی به محیط روده راه یابند و در آن‌جا اثرات سودمند خود را ایفا کنند. ریزپوشانی، به‌طور موفقیت‌آمیزی برای حفاظت سلول‌های پروبیوتیک در شرایط ذکر شده مؤثر می‌باشد (Kailasapathy، ۲۰۰۲؛ Karimi و همکاران ۲۰۱۲؛ Tripathi و همکاران، ۲۰۱۴). با توجه به اهمیت ماهی باس دریایی آسیایی در ایران و جهان و فقدان اطلاعات روی اثر ریزپوشانی باکتری‌های با توان پروبیوتیکی جدا شده از ماهی بر عملکرد رشد و آنزیم‌های گوارشی در ماهی باس دریایی، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی این ماهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری پروبیوتیک: در این تحقیق از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداسازی شده از فلور باکتریایی روده ماهی شیربت (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۲) استفاده شد. باکتری‌های مورد نظر در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون درآمده و بر اساس لوله‌های استاندارد مک فارلند با غلظت ۲/۴×۱۰۹ باکتری زنده در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند و برای تیمار پروبیوتیکی و نیز جهت ریزپوشانی کردن مورد استفاده قرار گرفتند.

فرآیند ریزپوشانی (Micro encapsulation): در این تحقیق براساس روش Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) از تکنیک ریزپوشانی امولسیون بهره‌گیری شد. به‌طور خلاصه ابتدا پودر کربنات کلسیم در آب مقطر اضافه و سونیکه شده و به محلول آلژینات ۲٪ اضافه شد و روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی با دور ۲۰۰rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه هموژن گردید. محلول حاصل با سوسپانسیون میکروبی با غلظت (۲/۴×۱۰۹ در هر میلی‌لیتر) مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه با هم‌زن با دور ۳۵۰rpm هموژن گردید. در بشردیگر، مقدار ۳۵ میلی‌لیتر روغن گیاهی (روغن

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

کلزا) با ۰/۵ گرم Span۸۰ مخلوط شده و به‌مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰ هم‌زده شد. سپس محلول حاصل با محلول بالا مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه با هم‌زن آزمایشگاهی هموژن گردید. ۱۰ میلی‌لیتر روغن کلزا و ۰/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک با هم مخلوط شد و مخلوط حاصل قطره قطره به محلول فوق اضافه گردید تا pH به حدود ۳/۵ برسد و ۳۰ دقیقه با دور rpm۲۰۰ هم‌زده شد. سپس با سانتریفیوژ روغن جدا شده و در مرحله نهایی به‌میزان ۱۵ سی‌سی محلول کیتوزان ۰/۴ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه ، قطره قطره با دور rpm۸۰۰ به محلول اضافه شدو هم‌زدن یک ساعت ادامه یافت. محصول نهایی (باکتری‌های ریزپوشانی شده) به‌وسیله سانتریفیوژ با دورrpm ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری گردید.

آماده‌سازی ماهیان مورد آزمایش: این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی شیلات استان بوشهر انجام شد. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه‌ماهی باس دریایی آسیایی با میانگین وزنی ۲/۸±۳۷/۳۶ گرم از مرکز تکثیر و پرورش راموز توسط خودروی حمل بچه‌ماهی مجهز به کپسول اکسیژن به ایستگاه تحقیقات شیلات و به مخازن مورد نظر منتقل شدند. ماهی‌ها در طی دو هفته قبل از آزمایش زیر نظر گرفته شده و آزمایش‌های سلامت آن‌ها مورد بررسی و تایید قرار گرفت. ماهیان در این دوره با غذای تجاری (شرکت تولید خوراک دام، طیور و آبزیان ۱۲۱بیضای شیراز) تغذیه و در ۱۲ مخزن فایبرگلاس (۴ تیمار هرکدام با ۳ تکرار) با حجم آب‌گیری L ۱۰۰۰ و با تراکم ۳۰ قطعه در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. به‌منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان، ۴ تیمار غذایی به‌شرح جدول ذیل تهیه شد:

جدول ۱: تیمارهای غذایی مورد استفاده در آزمایش

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار۱	لاکتوباسیلوس بدون ریزپوشانی	۹۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۲	لاکتوباسیلوس ریزپوشانی شده	۹۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۳	آلژینات/ کیتوزان بدون باکتری	۹۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار۴ (شاهد)	بدون مکمل پروبیوتیکی	۹۰ قطعه (در سه تکرار)

بدین‌منظور، غذای مورد نیاز برای هر هفته محاسبه و به‌میزان ۲×۱۰۹ باکتری ریزپوشانی شده به هر گرم غذا اضافه شد و سپس در شرایط سایه و در مجاورت جریان هوا خشک و در طول مدت مصرف در یخچال نگه‌داری گردید.

بررسی شاخص‌های رشد: در روز ۶۰ آزمایش با استفاده از ماده بی‌هوشی ۲-فنوکسی اتانول (۳/ میلی‌لیتر در لیتر) تمامی ماهیان بی‌هوش شدند. پس از وزن‌کشی و زیست‌سنجی ماهیان با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) و خط‌کش مدرج حرفه‌ای، شاخص‌های رشد براساس رابطه‌های زیر مورد ارزیابی قرار گرفت (Mohammadian و همکاران، ۲۰۱۷):

ضریب رشد ویژه (SGR) = ۱۰۰× (دوره پرورش به روز/Ln w2 – w1)

ضریب تبدیل غذایی (FCR) =

میزان کل وزن تر کسب شده (گرم)/ میزان غذای دریافت شده (گرم)

میزان کارایی پروتئین (PER) =

میزان وزن تر کسب شده (گرم)/ میزان کل پروتئین دریافت شده

فاکتور وضعیت (CF) =

۱۰۰× [(طول کل ماهی سانتی‌متر) L3 / (وزن ماهی گرم) W]

میزان رشد روزانه (DWG) =

میانگین وزن نهایی- میانگین وزن اولیه (گرم)/ تعداد روزهای آزمایش

درصد میزان بقاء=۱۰۰×(تعداد ماهیان اولیه/ تعداد ماهیان زنده مانده)

میزان رشد نسبی (RGR)=

۱۰۰× (وزن نهایی (گرم)- وزن اولیه (گرم)/ وزن اولیه (گرم))

انجام مراحل نمونه‌گیری از دستگاه گوارشی: نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان (یک سانتی‌متر ابتدای روده) در روز صفر (شروع آزمایش)، ۳۰ و ۶۰ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را بعد از خونگیری سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت گیرد. سپس بلافاصله به دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (مخزن ازت مایع) منتقل شدند (Kuz'mina و همکاران، ۲۰۱۰). هنگام آزمایش، نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از مخزن ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردیدند و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به‌داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی حجمی) محلول بافر هموژن (برای ساخت بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی (پروتئاز، آلفا-آمیلاز و لیپاز)، ۱۰۰ mM Tris-Hcl، ۰/۱ mM EDTA، ۰/۱٪ Triton 100X در pH ۷/۸ ترکیب گردید) سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند (Mohammadian و همکاران، ۲۰۱۷؛ Cahu و همکاران، ۱۹۹۹).

سنجش آنزیم‌های گوارشی

تهیه عصاره آنزیمی: نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به‌داخل اپندورف‌ها ریخته شد و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ (rpm۱۰۰۰۰، به‌مدت ۱۰ دقیقه) گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (Rungruangsak Torrissen و همکاران، ۲۰۰۲).

استخراج آنزیم روده‌ای: برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول ۵۰ mM، بافر HCl-Tris ۲ mM در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی استفاده گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در rpm۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد Cahu و همکاران، ۱۹۹۹). پس از هموژن

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

کردن نمونه‌ها دربافر فوق، کلرید کلسیم M ۰/۱ به‌هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: فعالیت ۴ آنزیم گوارشی آلفا آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، فسفاتاز قلیایی موردبررسی قرار گرفت. از آن‌جایی که آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و در دسته پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، لذا محاسبات فعالیت آنزیمی براساس پروتئین محلول انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز: برای تعیین فعالیت آلفا آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. در این واکنش نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که میزان تولید مالتوز در واحد زمان در حضور معرف رنگی دینیترو سالیسیلیک اسید و با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز سنجیده می‌شود. برای تعیین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده) با نسبت ۱:۲۰ (با آب مقطر سرد و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول نشاسته ۱ درصد) محلول در بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۶ میلی‌مولار در ۶/۹ (pH=به یک لوله آزمایش و ۲۵۰ میکرولیترآب مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر از محلول نشاسته ۱ درصد نیز به لوله‌ی دیگری به‌عنوان شاهد اضافه شد. لوله‌ها ۳ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به دمای تعادل برسند. بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف رنگی به لوله‌ها اضافه گردید و هر دو لوله به‌مدت دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای ساخت معرف رنگی، ۱۲ گرم از سدیم پتاسیم تارتارات در۸ میلی‌لیتر از سود ۲ مولار حل شد و به آن محلول دینیتروسالیسیلیک اسید ۹۶ میلی‌مولار در آب اضافه گردید. پس از آن، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی به لوله شاهد اضافه و سپس لوله‌ها در دمای اتاق خنک شدند و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید. محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شد و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری مشاهده شده در منحنی استانداردمالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به‌دست آمد (Bernfeld، ۱۹۵۱؛ Worthington، ۱۹۹۱). واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، برحسب میلی‌مول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم آلفاآمیلاز در مدت ۳ دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فاکتور رقت} \times \frac{\text{میزان مالتوز آزاد شده (میکرومول)}}{\text{مدت زمان انکوباسیون(دقیقه)} \times \text{میزان پروتئین در نمونه (میلی گرم)}} = \text{میزان پروتئین (میلی‌گرم)/ فعلیت آنزیمی (U)}$$

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز: برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington(۱۹۹۱)استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم لیپاز تجزیه و به دی‌گلیسیرید و اسیدچرب تبدیل می‌شود. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم نیاز به بافر ۰/۸ مولار Tris-Hcl ، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ میلی‌مولار و معرف تیمولفتالئین ۰/۹ درصد بود. بدین جهت به دو لوله آزمایش تست (T) و بلانک (B)، ۵/۱ میلی‌لیتر امولسیون روغن زیتون، ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تریس اضافه و مخلوط گردید. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی جدا شده به‌درون لوله T ریخته شد و هر دو لوله ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا در این مدت عمل هضم چربی‌ها توسط لیپاز صورت گیرد. به‌صورت جداگانه ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی از قبل تهیه شده را در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و علامت B بر روی آن نوشته شد و بلافاصله به‌درون یخچال قرار داده شد تا خنک شود. بعد از اتمام مدت زمان انکوباسیون درون بن‌ماری محتویات لوله B به ارلن مایر داخل یخچال و محتویات لوله T به ارلن مایر دیگری (T) انتقال داده شد. سپس لوله‌های آزمایش با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به‌خوبی شسته و روی ارلن‌های مربوطه ریخته و مخلوط شد. سپس به هر ارلن ۴ قطره معرف تیمول فتالئین اضافه شد و سپس در یک بورت تمیز محلول هیدروکسیدسدیم ریخته و تا ایجاد رنگ آبی روشن بر روی هریک از ارلن‌ها تیتراسیون انجام گرفت و میزان هیدروکسید سدیم مصرفی ثبت شد و میزان فعالیت لیپاز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

واحد آنزیم = T - B

که در این فرمول T و B میزان میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم مصرف شده برای ارلن T و B میزان میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم مصرف شده برای ارلن B است. حاصل این تفریق میزان میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی‌مولار در لیتر است که برای خنثی‌سازی اسیدهای چرب آزاد شده از لیپیدها در زمان ۳۰ دقیقه انکوباسیون استفاده شده است. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقداری از آنزیم که یک میکرو اکی‌والان اسید چرب را از یک مول تری‌گلیسیرید در مدت یک ساعت هیدرولیز می‌کند، بیان می‌شود. بنابراین تفاضل دو عدد B و T مقدار عددی فعالیت آنزیم است (واحد مرسوم). برای به‌دست آورن واحد بین‌المللی فرمول زیر به‌کار می‌رود:

$$\text{فاکتور رقت} \times \frac{\text{مدت زمان انکوباسیون} \times ۲ \text{(میلی لیتر بلانک شاهد - میلی لیتر بلانک نمونه}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (میلی گرم)}} = \text{میزان پروتئین (میلی‌گرم)/ فعلیت آنزیمی (U)}$$

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: جهت سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت آلکالین فسفاتاز (Ref:.۱۰-۵۰۳) استفاده شد. مقدر ۴۰۰ میکرولیتر از بافر بی‌کربنات را با ۱۰۰ میکرولیتر معرف پارا نیتروفنیل فسفات ۰/۱ مولار مخلوط شد و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت و ۲۰میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

شده به آن اضافه گردیده و ۱۵دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه شد تا واکنش متوقف شود و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. پارا نیترو فنیل فسفات تحت اثر آنزیم آلکالین فسفاتاز به پارانیتروفنول هیدرولیز می‌شود. شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود و توقف واکنش به لوله آزمایش اضافه گردید.

تغییر میزان جذب ×۱۰۰۰=فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد
جذب شاهد - جذب نمونه = تغییر میزان جذب

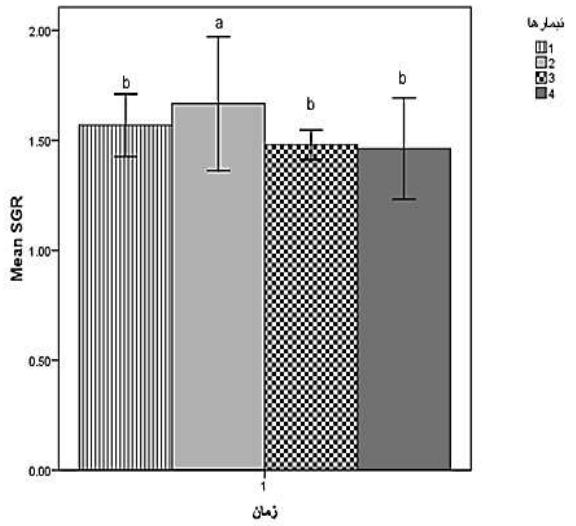
سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز: برای سنجش آنزیم پروتئاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای کازئین به‌عنوان سوبسترای معمولی مطالعه شد. هیدرولیز کازئین توسط محلول آنزیمی با اندازه گیری جذب در ۵۵۰ نانومتر به روش نقطه پایان اندازه‌گیری شد. محلول واکنش ۵۰۰ میکرولیتر شامل: ۲۵۰میکرولیتر بافر تریس ۵۰میلی‌مولار با اسیدیته ۸ به‌همراه سوبسترای محلول کازئین ۲درصد، ۵ میکرولیتر $cacl_2$، و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. این محلول به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس برای متوقف کردن واکنش ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۵ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) افزوده و در دور g۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول رویی حاوی اسیدهای آمینه هیدرولیز شده سوبسترای کازئین برداشته و به لوله حاوی ۵۰۰ میکرولیتر NAOH نیم مولار اضافه شد. سپس ۲۵ میکرولیتر فولین به لوله اضافه شده و پس از ۱۰دقیقه جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی واکنش‌ها از محلول شاهد استفاده شد که قبل از افزودن آنزیم، محلول TCA اضافه می‌شد. سپس میزان پروتئاز کل را براساس شیب خط به‌دست آمده از استاندارد تیروزین محاسبه شد (Badoei-Dalfard و همکاران، ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای هنداژمون یا تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به میانگین در تیمارهای مورد آزمایش، از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد و تاثیر پروبیوتیک بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی بین ۴ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین سطح معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ ٪ استفاده شد. هم‌چنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

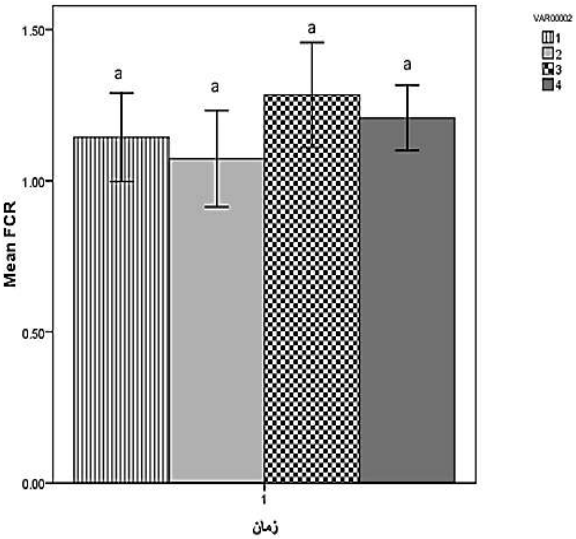
بررسی شاخص‌های رشد

میزان رشد ویژه (SGR): شاخص رشد ویژه در گروه تغذیه شده با خوراک حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده از همه تیمارها بیش‌تر بود و با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). ولی بقیه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (P>۰/۰۵).



شکل۱: مقایسه میانگین میزان ضریب رشد ویژه بین تیمارهای مختلف تحقیق. حروف همنام در نمودار نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بین تیمارها می‌باشد (P>۰/۰۵).

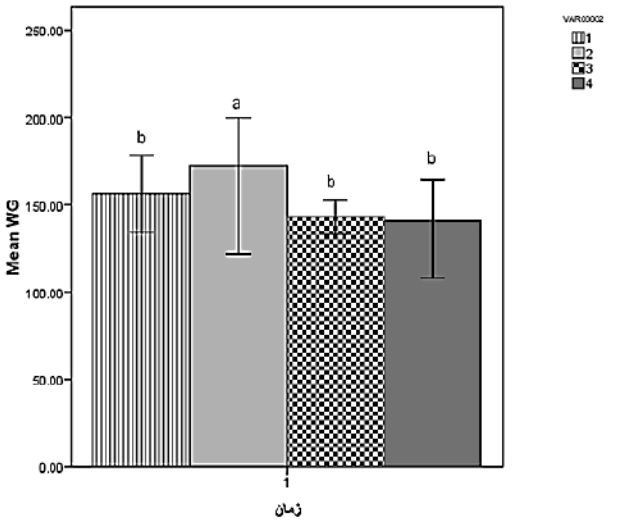
ضریب تبدیل غذایی (FCR): کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات کیتوزان مشاهده شده هر چند این کاهش با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).



شکل۲: مقایسه میانگین میزان FCR بین تیمارهای مختلف. حروف همنام در نمودار، نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بین آن تیمارها می‌باشد (P>۰/۰۵).

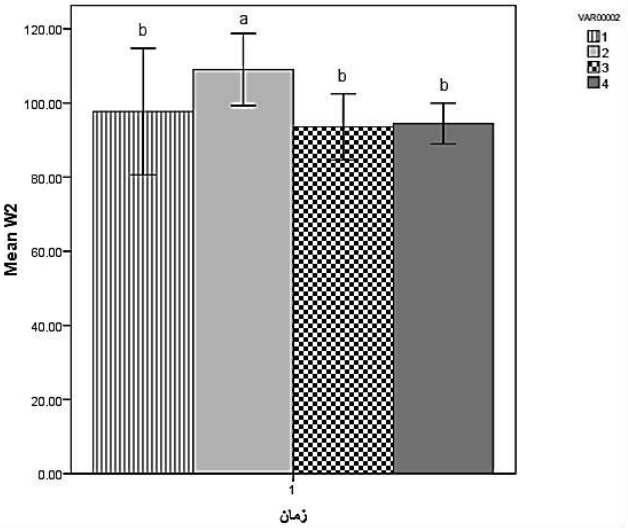
(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

شاخص وزن‌گیری (WG): این شاخص نیز در گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با ریزذرات کیتوزان/آلژینات بالاتر از بقیه تیمارها و دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵).



شکل۳: مقایسه میانگین میزان WG بین تیمارهای مختلف. حروف همنام در نمودار، نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بین آن تیمارها می‌باشد (P>۰/۰۵).

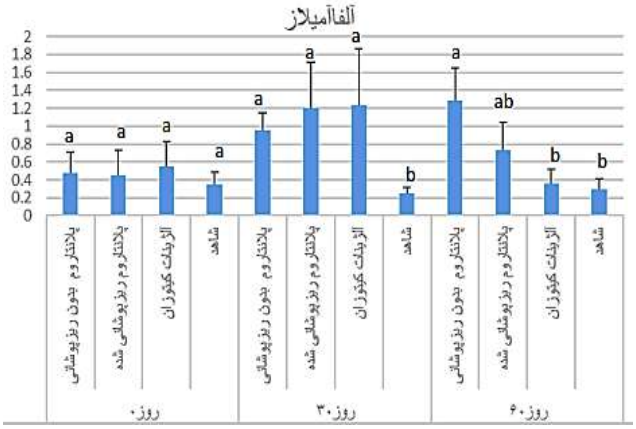
وزن نهایی (Final Weight): وزن نهایی در گروه تغذیه شده با خوراک حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با ریزذرات آلژینات/ کیتوزان افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت (p<۰/۰۵).



شکل۴: مقایسه میانگین وزن نهایی بین تیمارهای مختلف. حروف همنام در نمودار، نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت بین آن تیمارها می‌باشد (P >۰,۰۵).

آزمایش‌های ارزیابی آنزیم‌های گوارشی

بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز: مطابق شکل ۵، در ابتدای دوره آزمایش میزان فعالیت آلفاآمیلاز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری را از خود نشان نداد (P>۰/۰۵) اما در نمونه‌برداری میان دوره همه گروه‌های آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که کم‌ترین میزان مربوط به گروه شاهدو بیش‌ترین میزان آن مربوط به گروه آلژینات کیتوزان بود. در نمونه‌برداری انتهای دوره گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده از همه بیش‌تر بود که با گروه آلژینات کیتوزان و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).

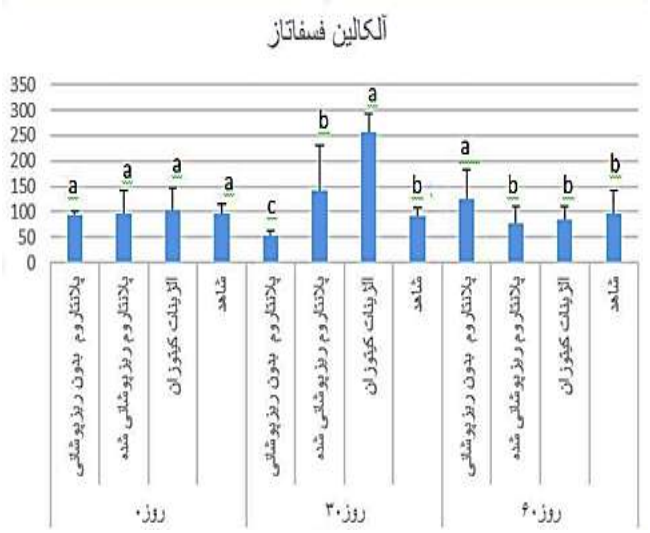


شکل ۵: فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در تیمارهای مختلف در روز صفر و میان دوره و انتهای دوره آزمایش. ستون‌هایی که دارای حروف لاتین مشابه در بالای ستون‌هاهستند،از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در هر دوره نمونه‌برداری در سطح (p<۰/۰۵) ندارند.

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: مطابق شکل ۶، در ابتدای دوره آزمایش(روز صفر)میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری را از خود نشان نداد (P>۰/۰۵). در نمونه‌برداری میان دوره گروه آلژینات کیتوزان بیش‌ترین میزان را داشتند که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، ولی با گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در نمونه‌برداری انتهای دوره فعالیت این آنزیم در گروه پلانتاروم ریزپوشانی نشده ازهمه بیش‌تر بود ولی با بقیه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). آلکالین فسفاتاز در گروه‌های شاهد و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده تغییر معنی‌داری را از خود نشان ندادند. گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده با گذر زمان روند کاهشی به خود گرفت به طوری‌که کم‌ترین مقدار، در انتهای دوره مشاهده گردید.

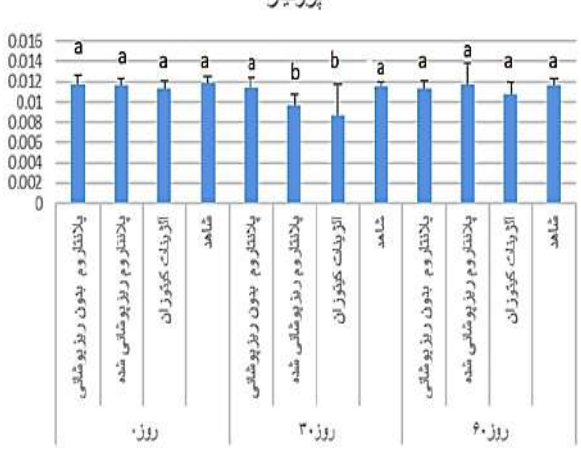
بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز: فعالیت آنزیم پروتئاز در روز صفر فاقد تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بود(P>۰/۰۵). در میان دوره بیش‌ترین فعالیت آنزیم به‌ترتیب در گروه شاهد و سپس لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده مشاهده شد که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). در نمونه‌گیری انتهای دور نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (شکل ۷).

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

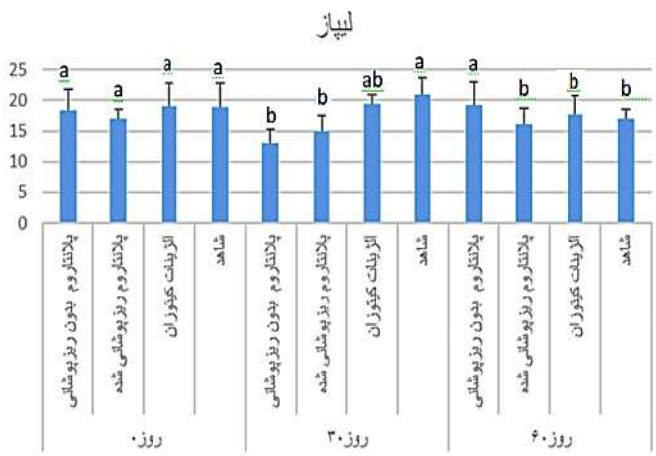


شکل ۶: آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف در روز صفر و میان دوره و انتهای دوره آزمایش. ستون‌هایی که دارای حروف لاتین مشابه در بالای ستون‌ها هستند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در هر دوره نمونه‌برداری در سطح (p<۰/۰۵) ندارند.

بررسی فعالیت آنزیم لیپاز: مطابق شکل ۸، فوق اختلاف معنی‌دار در ابتدای دوره آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵).اما در نمونه‌برداری میان دوره گروه شاهد بیش‌ترین فعالیت آنزیم لیپاز را نشان داد که با همه گروه‌ها به‌جز گروه آلژینات کیتوزان اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در انتهای دوره فعالیت این آنزیم در گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی نشده به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). ولی بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم لیپاز در روز ۶۰ مشاهده نشد.



شکل ۷: فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف در روز صفر، میان دوره وانتهای دوره آزمایش. ستون‌هایی که دارای حروف لاتین مشابه در بالای ستون‌ها هستند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در هر دوره نمونه‌برداری در سطح (p<۰/۰۵) ندارند.



شکل ۸: فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف در روز صفر، میان دوره و انتهای‌دوره آزمایش. ستون‌هایی که دارای حروف لاتین مشابه در بالای ستون‌ها هستند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح (p<۰/۰۵) ندارند.

بحث

استفاده از پروبیوتیک‌ها همواره با محدودیت‌هایی هم‌چون عدم امکان غلبه بر میکروبیوتای بومی و در نتیجه عدم تشکیل کلنی پایدار در روده، عدم تحمل اسید معده و نمک‌های صفراوی روبرو بوده است که باعث شده تا پژوهشگران همیشه به‌دنبال راه‌هایی برای افزایش ماندگاری این میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش باشند. در تحقیق حاضر باکتری پروبیوتیکی بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌وسیله ریز ذرات آلژینات سدیم و کیتوزان به‌روش امولسیون داخلی ریزپوشانی شده و اثرات مثبت آن بر برخی از شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی گزارش گردید. نتایج این تحقیق با مقایسه تجویز پروبیوتیک به تنهایی با پروبیوتیک ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان و آلژینات بر شاخص‌های رشد باس دریایی نشان داد که ریزپوشانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ریزذرات کیتوزان و آلژینات تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد داشته است. علی‌رغم این‌که تجویز پروبیوتیک فاقد ریزپوشانی و نیز ریزذرات کیتوزان و آلژینات به تنهایی (فاقد پروبیوتیک)، تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد باس دریایی آسیایی نداشت. نتایج فوق به‌خوبی گویای اثر مثبت ریزپوشانی‌برکارایی و توان پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌باشد. پروبیوتیک‌ها همواره به‌دلیل داشتن مزایای فراوان به‌عنوان یکی از راه‌های افزایش بازده آبزی‌پروری مطرح بوده‌اند. Pirarat و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود افزایش رشد ماهی تیلاپیای نیل بعد از تجویز خوراکی پروبیوتیک را به افزایش سطح جذب روده به‌علت طویل‌تر شدن پرزهای روده دانستند، هم‌چنین آن‌ها تحریک تکثیر سلول‌های اپیتلیالی روده را نیز دلیل دیگر بهبود رشد بعد از تجویز پروبیوتیک

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

گزارش کردند. احتمالاً بهبود رشد مشاهده شده در تحقیق جاری به علت افزایش زنده‌مانی باکتری‌ها در شرایط معده و روده بعد از ریزپوشانی باریزذرات آلژینات کیتوزان بوده است. هم‌چنین Ichikawa و همکاران (۱۹۹۹) استدلال کردند که پروبیوتیک‌ها پس از رسیدن به روده شروع به تکثیر کرده و از قندها جهت رشد خود و تولید مواد سازنده اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه استفاده می‌کنند. این اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریزپرزهای روده دارند. اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه به‌خصوص بوتریک اسید به‌عنوان اصلی‌ترین منبع انرژی برای سلول‌های اپیتلیال روده محسوب می‌شود. هم‌چنین بوتریک اسید می‌تواند باعث آزادسازی پپتیدهای روده‌ای و فاکتورهای رشدی شوند که در تکثیر سلول‌های اپیتلیالی موثرند (Blottiere و همکاران، ۲۰۰۷؛ Pelicano و همکاران، ۲۰۰۵). درصد افزایش وزن نسبی و وزن نهایی ماهی‌ها نیز در تحقیق حاضر در روز ۶۰ تیمار دوم (بیش‌ترین) با تیمارسوم (کم‌ترین) اختلاف معنی‌دار را نشان دادند. این مسأله احتمالاً می‌تواند مربوط به اثر نامطلوب کیتوزان بر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باشد که نتوانسته بر شاخص‌های رشد اثر مثبتی داشته باشد چرا که در تیمار دو که از کیتوزان جهت ریزپوشانی باکتری استفاده نگردیده بود عملکرد رشد بهتری مشاهده شد. در مطالعه Tafi و همکاران (۲۰۱۵) و Shiau و Yu (۱۹۹۹) اثرسوء تغذیه‌ای تجویز خوراکی کیتوزان به‌ترتیب بر قزل‌آلای رنگین‌کمان و تیلاپیا گزارش شد که هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. البته گزارش‌هایی هم حاکی از تاثیر مثبت کیتوزان بر شاخص‌های رشد ماهیان مختلف می‌باشد. Gopalakanna و Arul (۲۰۰۶) اثر مثبت تجویزخوراکی کیتوزان ۱ درصد را بر رشد ماهی کپورمعمولی گزارش کردند. Geng و همکاران (۲۰۱۲) نیز، کیتوزان به میزان ۳ و ۶ (گرم/کیلوگرم غذا) را باعث افزایش برخی شاخص‌های رشد ماهی سوکلا دانستند. اختلاف نتایج فوق می‌تواند به‌دلیل تفاوت در گونه ماهی، گونه پروبیوتیک و نوع کیتوزان مصرفی مربوط باشد، البته شرایط انجام تحقیق به‌ویژه دما و کیفیت آب نیز در تفاوت نتایج گزارشات موثراست. آنزیم‌های گوارشی برای متابولیسم طبیعی سلول‌ها و سلامتی جانور ضروری هستند و هم‌چنین به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی در فیزیولوژی گوراش در ماهیان مورد توجه بوده و پارامترهای مهمی در ارزیابی کیفیت هضم و جذب و سلامت ماهی هستند. در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از تجویز خوراکی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ریزپوشانی و بدون ریزپوشانی در ماهی باس دریایی به‌مدت هشت هفته، نشان داد که میزان آنزیم‌های لیپاز، در ماهیان تغذیه شده با پلانتاروم بدون ریزپوشانی در میان دوره و انتهای دوره آزمایش و میزان آنزیم‌های پروتئاز و آلکالین‌فسفاتاز در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک پلانتاروم بدون پوشش افزایش داشته است ($p<0/05$)، اما فقط افزایش آلکالین فسفاتاز و پروتئاز معنی‌دار بود ($p<0/05$). دلیل آن ممکن است به‌علت رشد بیش‌تر سلول‌های ترشح‌کننده آنزیم (Tovar و همکاران، ۲۰۰۲)، ترشح محدوده وسیعی از آنزیم‌های باکتری پروبیوتیکی (اگزوآنزیم‌ها) و یاافزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (اندوآنزیم‌ها) باشد. میزان آنزیم‌های گوارشی نیز در ماهیان تغذیه‌شده باکیتوزان و آلژینات به‌تنهایی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، اما این اختلاف در بیش‌تر موارد معنی‌دار نبود ($p>0/05$). هم‌چنین گروه شاهد نسبت به تیمار سه افزایشی را در میزان فعالیت لیپاز در طی این ۴ هفته نشان داد ($p<0/05$). *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* به‌دلیل افزایش توانایی دستگاه گوارش این ماهی‌ها در هضم بهتر ذرات غذایی مانند نشاسته، چربی، پروتئین در افزایش میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، پروتئاز و لیپاز نقش دارد (Essa و همکاران، ۲۰۱۰؛ Abumourad و همکاران، ۲۰۱۳؛ Marlida و همکاران، ۲۰۱۴). Azari و همکاران (۲۰۱۱) افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، پروتئاز و لیپاز نوزادان قزل‌آلای رنگین‌کمان در نتیجه مصرف پروبیوتیک (Aqualase) و پری‌بیوتیک تجاری (Aqualase x) را به‌مدت ۱۲هفته گزارش کردند. یکی از نتایج تحقیق اختلاف فعالیت آنزیم‌های گوارشی بین تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده و تیمار فاقد ریزپوشانی بود. ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بدون ریزپوشانی ترشح آنزیم‌های پروتئاز، آلکالین فسفاتاز و لیپاز نسبت به تیمارهای ریزپوشانی شده بیش‌تر بود. به‌نظر می‌رسد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه دستگاه گوارش بچه‌ماهیان باس دریایی باعث افزایش فعالیت آنزیم گوارشی مختلف گشته است. هرچند در تیمار ریزپوشانی افزایش چندانی در آنزیم‌های گوارشی مشاهده نگردید. لازم به ذکر است که تیمار *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشانی شده برخلاف تأثیر کم‌تر آن در آنزیم‌های گوارشی (نسبت به تیمار پلانتاروم بدون پوشش)، دارای بهترین عملکرد شاخص‌های رشدی در میان تیمارهای آزمایشی بود. احتمالاً دلیل این تفاوت را می‌توان به ماده ریزپوشانی (آلژینات و کیتوزان) نسبت داد. احتمالاً علی‌رغم تاثیر مثبت ریزپوشانی در رشد ماهی، تاثیر این مواد در ترشح آندوآنزیم‌های ماهی و نیز اگزو آنزیم‌های باکتریایی منفی بوده است. احتمالاً باکتری‌های خارج شده از کپسول آلژینات و کیتوزان توانایی تولید اگزوآنزیم‌های گوارشی به‌میزان باکتری‌های آزاد را نداشته‌اند، از طرفی با توجه به برخی گزارشات از اثرات ضدتغذیه‌ای کیتوزان (Ya و Shiau، ۱۹۹۹)، کیتوزان پوششی روی باکتری روی روند ترشح آنزیم‌های گوارشی تاثیر منفی داشته و اثر مثبت پروبیوتیک را کاهش داده است. از آن‌جاکه نتیجه مطلوب نهایی در مصرف پروبیوتیک‌ها بهبود رشد و افزایش مقاومت ماهی در برابر عوامل استرس‌زا می‌باشد، علی‌رغم این‌که ریزپوشانی باکتری

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

لاکتوباسیلوس پلانتاروم باعث کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی شده است، ولی با توجه به بهبود معنی‌دار و مشخص تمام شاخص‌های رشد می‌توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی پروبیوتیک به‌روش توصیه شده در این تحقیق در افزایش کارایی پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم موثر بوده است و کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی با بهبود سایر عوامل تاثیرگذار و ناشناخته رشد، جبران شده است. لذا استفاده از روش ریزپوشانی مایع‌سازی داخلی با ریزذرات آلژینات و کیتوزان برای بهبود کارایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی باس دریایی آسیایی توصیه شده و انجام تحقیق در شرایط مزرعه‌ای توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

تقدیر و تشکر از رییس و معاون تحقیقاتی و رییس بخش بهداشت و بیماری‌ها سرکارخانم مریم میربخش و کارشناسان آزمایشگاه پژوهشکده میگوی کشور-بوشهر سرکارخانم مهندس احترام محمدی و تشکر از جناب دکتر سیاوش سلطانیان استاد راهنمای پروژه و دکتر غلامحسینی و دکتر رضا سلیقه‌زاده که در اجرای پروژه همکاری صمیمانه داشتند.

منابع

۱. **محمدیان، ت.، ۱۳۹۲.** ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده ماهی شیربت (*Tor grypus*). پایان‌نامه دکترای PhD بهداشت آبزیان از دانشگاه شهید چمران اهواز. شماره ۹۲۵۸۹۵۶.

۲. **Abumourad, I.; Abbas, T.; Awaad, E.; Authman, M.; El Shafei, K.; Sharaf, O.M.; Ibrahim, G.A.; Sadek, Z.I. and El-Sayed, H.S., 2013.** Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. Journal of Applied Sciences Research. Vol. 9, No. 1, pp: 572-582.

۳. **Ashouri, G.; Soofiani, N.M.; Hoseinifar, S.H.; Jalali, S.A.H.; Morshedi, V.; Van Doan, H. and Mozanzadeh, M.T., 2018.** Combined effects of dietary low molecular weight sodium alginate and Pediococcus acidilactici MA18/5M on growth performance, haematological and innate immune responses of Asian sea bass (*Lates calcalifer*) juveniles. Fish and shellfish immunology. Vol. 79, pp: 34-41.

۴. **Azari, A.H.; Hashim, R.; Rezaei, M.H.; Baei, M.S.; Najafpour, S.; Roohi, A. and Darvishi, M., 2011.** The effects of commercial probiotic and prebiotic usage on growth performance, body composition and digestive enzyme activities in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Applied Sciences Journal. Vol. 14, pp: 26-35.

۵. **Badoei-Dalfard, A. and Karami, Z., 2013.** Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from Bacillus sp. JER02: activity optimization by response surface methodology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 89, pp: 15-23.

۶. **Bernfeld, P., 1951.** Amylases α and β. In methods in enzymology, vol.1 (Colowick, P. and Kaplan, N.O., eds), New York: Academic press. pp: 149-157.

۷. **Blottiere, H.M.; Buecher, B.; Galmiche, J.P. and Cherbut, C., 2007.** Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceedings of the Nutrition Society. Vol. 62, pp: 101-106.

۸. **Cahu, C.L.; Zambonino Infante, J.L.; Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., 1999.** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. Vol. 171, pp: 109-119.

۹. **Essa, M.A.; El-Serafy, S.S.; El-Ezabi, M.M.; Daboor, S.M.; Esmael, N.A. and Lall, S.P., 2010**. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 5, No. 2, pp: 143-161.

۱۰. **FAO. 2010.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2009. Rome. 180 p.

۱۱. **Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. Vol. 66, pp: 365-378.

۱۲. **Geng, X.; Dong, X.H.; Tan, B.P.; Yang, Q.H.; Chi, S.Y. and Liu, H.Y., 2012.** Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Aquacult Nutr. Vol. 18, pp: 46-55.

۱۳. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of Aeromonas hydrophila infection in ponds. Aquaculture. Vol. 255, No. 1-4, pp: 179-187.

۱۴. **Huiyi, S.; Weiting, Y.; Meng, G; Xiudong, L. and Xiaojun, M., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohydrate Polymers. Vol. 96, pp: 181-189.

۱۵. **Ichikawa, H.; Kuroiwa, T.; Inagaki, A.; Shineha, R.; Nishihira, T.; Satomi, S. and Sakata, T., 1999.** Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Digestive Diseases and Sciences. Vol. 44, pp: 2119-2123.

۱۶. **Kailasapathy, K., 2002.** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Current issues in intestinal microbiology. Vol. 3, No. 2, pp: 39-48.

۱۷. **Karimi, R.; Mortazavian, A.M. and Amiri-Rigi, A., 2012.** Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. Food Microbiology. Vol. 29, No. 1, pp: 1-9.

۱۸. **Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Aunapuu, M.; Kilk, K.; Arend, A. and Mikelsaar, M., 2003.** Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress- mediated atherogenicity in human subjects. Br J Nutr. Vol. 90, No. 2, pp: 449-456.

۱۹. **Kuz'mina, V.V.; Shekovtsova, N. and Bolobonina, V., 2010.** Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biology Bulletin. Vol. 37, pp: 605-611.

۲۰. **Marlida, R.; Agus Suprayudi, M.; Widanarni, A. and Harris, E., 2014.** Isolation, selection and application of probiotic bacteria for improvement the growth performance of humpback grouper (*Cormileptes altivelis*). International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR). Vol. 16, No. 1, pp: 364-379.

۲۱. **Mohammadian, T.; Alishahi, M.; Tabandeh, M.; Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D., 2017.** Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on growth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971). Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 16, No. 1, pp: 296-317.

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

۲۲. **Pelicano, E.R.L.; Souza, P.A.; Souza, H.B.A.; Figueiredo, D.F.; Boiago, M.M.; Carvalho, S.R. and Bordon, V.F., 2005.** Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. Revista Brasileira de Ciencia Accola. Vol. 7, pp: 221-229.

۲۳. **Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Endo, M.; Katagiri, T.; Ponpornpisit, A.; Chansue, N. and Maita, M., 2011.** Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in Veterinary Science. Vol. 91, pp: 92-97.

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

۲۵. **Shiau, S.Y. and Yu, Y.P., 1999.** Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*. Aquaculture. Vol. 4, pp: 439-446.

۲۶. **Tafi, A.A. and Meshkini, S., 2015.** Investigating effects of different values of Chitosan polysaccharide on growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

۲۷. **Tovar-Ramírez, D.; Zambonino, J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; Vázquez-Juárez, R. and Lésel, R., 2002** Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 204, pp: 113-123.

۲۸. **Tripathi, M.K. and Giri, S.K., 2014.** Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods. Vol. 9, pp: 225-241.

۲۹. **Worthington, C.C., 1991.** Worthington. Manual Related Biochemical.3th Edition. Freehold, New Jerse. pp: 80-85.

(DOI): 10.22034/aej.2020.114800

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 3, Autumn 2020

The effect of encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with Alginate/Chitosan Nano particles on growth performance and digestive enzyme activities in Asian sea bass (*Lates cacalifer*)

- **Mostafa Gholipour:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Siyavash Soltanian*:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Mostafa Akhlaghi:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
- **Mojtaba Alishahi:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Maryam Mirbakhsh:** Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
- **Hamidreza Gheysari:** Department of Food Hygiene and Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: June 2019 Accepted: September 2019

Keyword: *Lactobacillus plantarum* alginate/chitosan, Anti-oxidant enzyme

Abstract

The application of probiotics in aquaculture has been increased in recent years due to the many benefits for fish health. However, the gut environment, especially pH, limits the establishment of dietary probiotics. Encapsulating of probiotics within biodegradable nanoparticles has been found to increase their viability and efficiency in fish gut. In the current study, the effects of encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with alginate/chitosan Nano particles on growth performance and digestive enzyme activities in Asian sea bass (*Lates cacalifer*) were evaluated. 480 juvenile *L. cacalifer* were randomly divided into four treatments in triplicates. Fish in T1 received bacteria without any encapsulation, T2 received *Lactobacillus plantarum* encapsulated with alginate/chitosan, T3 were fed with alginate/chitosan enriched free probiotic diet and T4 received basic diet as a control group. All treatments were fed with experimental diets for 60 days. Fish were sampled on days 30 and 60 and growth indices and digestive enzyme activities were measured. The result revealed that the highest digestive enzyme activities were detected for α-amylase and alkaline phosphatase (ALP) and were observed on days 30 and 60 post-treatment in T3 and T1, respectively. However, the best growth performance was achieved on day 60 in T2 group. Apparently, the encapsulation of *L. plantarum* with alginate/chitosan Nano particles could improve its probiotic efficiency in terms of only the enhancement of growth parameters; however, such an improvement was not detected for digestive enzymes activities.

* Corresponding Author's email: siyavashsoltanian@yahoo.com