16(3) 89-98, Autumn 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of Different Marine Probiotics Individual and with B-Glucan on Digestive Enzymes Activity, and Intestine Flora of *Acanthopagrus Arabicus*

Mahdieh Nasirpour [1], Takavar Mohammadian [2,3*], Mehdi Soltani [3,4], Saeed Mirzagar [4], Hossein Houshmand [5]

[1] *Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Animal, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[3] *Iran Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[4] *Department of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[5] *South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Sciences Reasearch Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran*

Key Words

Lactobacillus plantarum
β-glucan
Digestive enzymes activity
Intestinal bacterial flora
Yellow fin seabream
(*Acanthopagrus arabicus*).

Abstract

Introduction: This research aimed to investigate the effects of using marine probiotics alone and in combination with β-glucan in the diet on digestive enzyme activity, antioxidant defense system activity, and some liver indicators in yellowfin seabream fish.
Materials & Methods: For this study, 450 juvenile fish weighing 13.1±0.49 gr were transferred from Imam Port Aquaculture Station to the college of Veterinary Medicine at Shahid Chamran University in Ahvaz. 4 treatments were considered: Lactobacillus plantarum (108 CFU/g), β-glucan (1%), probiotic+prebiotic, and control. Parameters of the antioxidant defense system such as activity of digestive enzymes including alkaline phosphatase (ALP), trypsin, chymotrypsin, lipase, and α-amylase, were examined. The total bacterial flora and the number of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract of yellowfin seabream (*Acanthopagrus arabicus*) were also investigated during the 60-day rearing period.
Results: The treatment with Lactobacillus plantarum showed significantly higher levels of some digestive enzyme activities (trypsin and α-amylase) compared to other treatments ($p<0.05$). The synbiotic treatment had lower values than the probiotic treatment in the experimental parameters. The control group showed higher performance than the prebiotic and synbiotic treatments in certain parameters. It appears that the indigenous bacteria *Lactobacillus plantarum* alone was able to improve the activity of some digestive enzymes, and lactic acid bacteria flora in yellowfin seabream fish.
Conclusion: The combination of synbiotic *Lactobacillus plantarum* with β-glucan is not a suitable combination for enhancing the health of yellowfin seabream fish, but due to the ecological and physiological characteristics of this fish species, which have been less studied so far, and also the lack of synergy between β-glucan and Lactobacillus plantarum in the tested fish, further experiments using different prebiotics are needed.

* Corresponding Author's email: t.mohammadian@scu.ac.ir
Received: 12 August 2023; Reviewed: 1 September 2023; Revised: 21 September 2023; Accepted: 11 October 2023
10.70102/AEJ.2025.16.3.12

مقاله پژوهشی

مقایسه تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (به تنهایی و همراه با بتاگلوکان) در جیره غذایی بر فلورباکتریایی دستگاه گوارش و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus arabicus*)

مهدیه نصیرپور[۱]، تکاور محمدیان[۲،۳*]، مهدی سلطانی[۳،۴]، سعید میرزگر[۴]، حسین هوشمند[۵]

[۱] دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۲] گروه بهداشت دام طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۵] پژوهشکده تحقیقات آبزی پروری‌جنوب کشور، موسسه علوم شیلاتی کشور، ،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

لاکتوباسیلوس پلانتاروم
بتاگلوکان
فعالیت آنزیم‌های گوارشی
فلور باکتریایی روده
شانک زرد باله
(*Acanthopagrus arabicus*)

چکیده

مقدمه: این پژوهش با هدف بررسی تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌های دریایی به تنهایی و همراه با بتاگلوکان در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی شاخص‌های کبدی در ماهی شانک زرد باله انجام شد.

مواد و روش‌ها: جهت انجام تحقیق ۴۵۰ بچه‌ماهی وزن ۰/۴۹±۱۳ گرم از ایستگاه آبزی‌پروری بندرامام به دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز منتقل شد. ٤ تیمار لاکتوباسیلوس پلانتاروم (CFU/gr 108)، بتاگلوکان (۱ درصد)، باکتری+پری‌بیوتیک و شاهد در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند آلکالین فسفاتاز قلیایی، تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز و آلفا آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. فلور باکتریایی کل و تعداد باکتری اسید لاکتیک دستگاه گوارش ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus arabicus*) در طول دوره پرورش ٦٠ روزه مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی (تریپسین و آلفا آمیلاز) و جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمار لاکتوباسیلوس پلانتاروم به شکل معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها مقادیر بالاتری را نشان داد (P>۰/۰۵). تیمار سین‌بیوتیک مقادیر پایین‌تری را نسبت به تیمار پروبیوتیک در پارامترهای آزمایشی نشان دادند. تیمار شاهد نسبت به تیمارهای پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک در برخی پارامترها عملکرد بالاتری نشان داد. به‌نظر می‌رسد که باکتری درون‌زاد لاکتوباسیلوس پلانتاروم به تنهایی توانسته فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتری‌های اسیدلاکتیکی ماهی شانک زرد باله را بهبود بخشد.

بحث و نتیجه گیری: ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌همراه بتاگلوکان ترکیب مناسب و ارتقا دهنده سلامت ماهی شانک زرد باله نمی‌باشد اما به‌دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی و فیزیولوژیکی ماهی شانک زرد باله که تاکنون کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته و هم‌چنین عدم هم‌افزایی بتاگلوکان با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی مورد آزمایش، نیاز به آزمایشات بیش‌تر همراه با استفاده از پری‌بیوتیک‌های متفاوت‌تر از این آزمایش می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۷ خرداد۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۱۰تیر۱۴۰۲؛ تاریخ‌اصلاح: ۱۶ شهریور ۱۴۰۲؛ تاریخ‌پذیرش: ۱۹ مهر ۱۴۰۲
(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.3.12

مقدمه

همگام با افزایش رو به‌رشد آبزی‌پروری چالش‌هایی‌نظیر شیوع بیماری و کیفیت آب منجر به بروز ضررهای اقتصادی در این صنعت گردیده، به گونه‌ای که بروز عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی سبب‌بروز‌ضررهای‌اقتصادی‌چشم‌گیری‌شده‌است (۲). دستگاه گوارش ماهی یکی از مسیرهای مهم برای‌ورود عوامل بیماری‌زا به بدن است. بیوتای میکروبی روده از عوامل دفاعی مهم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است (۳۱). اما این عامل به تنهایی نمی‌تواند از ماهی در برابر بروز عوامل بیماری‌زا دفاع کند. از روش‌های سنتی پیشگیری و درمان‌بیماری‌ها، استفاده‌از‌آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی است. در سال‌های گذشته مطالعات نشان داد که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب ضررهای زیادی در آبزی‌پروری گردیده است ازجمله این ضررها می‌توان به بالا رفتن هزینه‌تولید (۳۶)، انباشتگی‌در محیط و در بدن آبزی‌و درنتیجه آلوده کردن محیط (۲۹) و درنهایت ایجاد سویه‌های مقاوم‌در‌بدن‌میزبان‌اشاره‌نمود (۳۰). ممنوعیت کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد در پرورش و کاهش مصرف آن درصنایع آبزی پروری به‌دلیل نگرانی از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های دستگاه‌گوارش‌آبزیان‌مزرعه‌منجر‌به‌استفاده‌روز افزون از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها گردیده است (۴). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات سودمندی بر میزبان خود (دام، طیور و آبزیان) ایفا می‌کنند. پروبیوتیک‌ها‌می‌توانند‌باکتریایی‌یا‌مخمری‌باشند. شرایط تولید صنعتی آبزیان هم به‌علت تراکم بالا، استرس‌های تولید و تغذیه، آلودگی آب، چالش‌های مدیریتی و همه‌گیری بیماری‌های عفونی موجب تضعیف سیستم ایمنی و برهم‌خوردن تعادل میکروبی دستگاه گوارش و درنتیجه آن رشد و تولید میکروارگانیسم‌های مضر و تولید سموم و متابولیت‌های آسیب‌زا می‌شود. تغییرات در آب استخرهای پرورشی و افزایش متابولیت‌هایی هم‌چون نیترات و مواد آلی نیز می‌تواند تاثیر منفی بر شرایط فوق داشته باشد. در نتیجه چنین تغییراتی کاهش عملکرد و افزایش تلفات در مزارع آبزیان مشاهده می‌شود. پروبیوتیک‌ها مکمل‌هایی بدون هیچ گونه عارضه جانبی برای پیشگیری از چنین مشکلاتی هستند که تاثیراتشان به کرات‌در آبزیان ثابت شده است. باتوجه به افزایش روز افزون تقاضای غذایی جمعیت رو به رشد ایران (نرخ رشد جمعیت ایران ۳/۱٪) یا باید واردات‌افزایش یابد و یا به افزایش تولید‌داخلی، از طریق استفاده از مکمل‌های‌خوراکی مانند پروبیوتیک‌ها، که بتوانند با بهبود ضریب تبدیل غذای (FCR) و بدون نیاز به افزایش جمعیت آبزیان منجر به افزایش راندمان تولید شوند، دست یابیم. پیش‌بینی می‌شود بازار پروبیوتیک‌ها تا سال۲۰۲۳ از مرز ۶۴ بیلیون دلار آمریکا گذر نماید که خود نشان از موفقیت جهانی این محصول است و هنوز کشور ما جایگاه خود را در این بازار بزرگ نیافته و همواره وارد کننده این محصولات هستیم. پروبیوتیک‌ها جهت داشتن اثر مثبت باید دارای خصوصیاتی باشد ازجمله: در بخش‌های بالای دستگاه گوارش جذب یا هیدرولیز نشود، توسط باکتری‌های مفید بومی دستگاه گوارش قابلیت تخمیر شدن ، توانایی تغییر ترکیب فلور باکتریایی روده‌ای به سمت ترکیبی سالم‌تر را داشته و در نهایت دارای اثر سودمند بر میزبان‌مصرف‌کننده باشد. پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین‌ها ار طریق تولید آنزیم‌های گوارشی نظیر آمیلاز و پروتئاز و تولید مواد مغذی‌ضروری (ویتامین‌ها، اسیدهای‌چرب‌زنجیره‌کوتاه) سبب‌افزایش میزان هضم و جذب مواد غذایی شده که این خود سبب بهبود شاخص‌های رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌گردد (۵۱). تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، بهبود تعادل میکروبی روده و درنتیجه بهبود هضم، جذب و مصرف غذا تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۷). بنابراین، این باکتری‌ها با شرکت در فرایند‌هضم، کارایی دستگاه‌گوارش را افزایش‌و درنهایت‌موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شوند. بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک آبزیان را درنتیجه بهبود و ارتقاء فرمولاسیون‌جیره، علاوه بر شاخص‌های رشد می‌توان با فاکتورهای‌خونی نیز ردیابی نمود (۴۷). طبق تحقیقات به عمل‌آمده کربوهیدرات‌ها، مواد غذایی مهم و ضروری برای باکتری‌ها می‌باشند (۲۳، ۴۹). پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات‌خوراکی‌غیرقابل هضمی هستند‌که‌عمدتا از رشد میکروارگانیسم‌ها به‌دست می‌آیندو از طریق تحریک رشد یا فعالیت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش تأثیرات سودمندی در رشد و سلامت‌جاندار می‌گذارند و موجب بهبود تعادل میکروبی دستگاه گوارش و کاهش باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند. همین‌طور تأثیر پری‌بیوتیک‌ها‌بر‌فعالیت‌آنزیم‌های گوارشی‌در بررسی‌های محققین مختلف بر روی آبزیان دیده شده است (۱۹). استفاده از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی‌رو به پیشرفت آبزی پروری همگام با محیط زیست به‌شمار می‌روند. در مزارع پرورش آبزیان از جمله نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ماهی‌ها، این زیست‌یارها جهت‌بهتر‌کردن کیفیت محیط زیست آبزی و افزایش میکروفلورهای مفید و سطح جذب روده در لوله گوارش ماهی و بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین است. از جمله سلول‌های مهم دستگاه گوارش می‌توان به سلول‌های لایه موکوسی اشاره کرد که این‌سلول‌ها با توجه به متابولیسم‌سلولی‌و حجم‌بالای واکنش‌های سریع، اهمیت زیادی در استفاده بهینه از غذا و جذب مواد غذایی دارند (۲۶). موکوس ترشح شده از سلول‌های جامی شکل روده، pH

پایین روده، وجود آنزیم‌های گوارشی و صفرا و بافت لنفوئیدی وابسته به روده (GALT) می‌توانند در ایجاد یک محیط مناسب علیه عوامل بیماری‌زا باشند (۲۱، ۲۵، ۴۵). از این رو هر گونه تغییری که در فیزیولوژی، ریخت شناسی، بیوشیمیایی روده رخ دهد، تاثیر مهمی بر روی سلامت ماهی خواهد داشت. تاثیر مهم دیگر این نوع مکمل‌ها کاهش میزان بروز و دوره بیماری، تقویت سیستم ایمنی و فعالیت‌های ضدویروسی است (۱۳). بنابراین این جز غذایی، می‌تواند نقش مهمی در کاهش تلفات، افزایش و بهبود رشد داشته باشد. مطالعات نشان می دهد که استفاده از پروبیوتیک‌های بومی (درون‌زاد) در مقایسه با انواع تجاری از کارایی بهتری برخوردار است. ماهی شانک زردباله (*Acanthopargus arabicus*) یک گونه دریایی می‌باشد که دارای اهمیت اقتصادی بالا و از بازارپسندی خوبی برخوردار است. این گونه از خانواده شانک ماهیان، با نام انگلیسی Yellowfin seabream می‌باشد (۳۵). این ماهی گونه‌ای ساحلی که در آب‌های کم‌عمق سکونت می‌کند، هم از لحاظ صیادی و هم آبزی‌پروری بسیار اهمیت بالایی دارد، پراکنش این گونه در آسیای شرقی، چین، تایوان، ژاپن و خلیج فارس است. به نظر می‌رسد استفاده از پربیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی این گونه بومی سبب بهبود رشد و کارایی تغذیه در این گونه گردد. به‌همین دلیل بررسی تاثیر بتاگلوکان به‌عنوان پری‌بیوتیک و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌عنوان پروبیوتیک درون‌زاد و ترکیبی از این دو مکمل جهت مقایسه اثر آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی در ماهی شانک زرد باله لازم به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

ماهی: تعداد ۴۵۰ ماهی شانک زردباله (*Acanthopargus arabicus*) با وزن ۱۳±۰/۴۹ گرم، از ایستگاه آبزی پروری بندرامام صید و به آزمایشگاه قطب بیماری‌های ماهیان گرمابی واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران اهواز منتقل و پس از دو هفته سازگاری در مخازن بتنی مستطیلی ۳۰۰ لیتری در۴ تیمار (با ۳ تکرار) تقسیم شدند. هر تیمار شامل تعداد ۳۰ قطعه بچه ماهی بود.

مکمل پربیوتیک حاوی بتاگلوکان: از مکمل پربیوتیک تولیدی شرکت SANA Group با نام تجاری XPC استفاده شد.

پروبیوتیک: از لاکتوباسیلوس پلانتاروم با کد (NCBA(MH155966.1 جدا شده از محیط دریایی برای این مطالعه استفاده گردید.

کیفیت آب پرورش: از آب‌شور با شوری ۵ گرم در لیتر استفاده شد و به منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز ماهیان، درون هر مخزن پنج عدد سنگ هوا متصل به هواده مرکزی قرار داده شد. دوره نوری در زمان انجام تحقیق به‌صورت ۱۲-۱۰ ساعت روشنایی و ۱۰-۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد و ماهیان در یک سالن سرپوشیده قرار گرفتند. دمای آب ۳۰/۵ تا ۲۸/۳ درجه در نوسان بوده و PH برابر ۸ و اکسیژن محلول آب ورودی ۸/۷ میلی‌گرم در لیتر (دستگاه اندازه‌گیری پرتابل مدل AZ تایوان) و آمونیاک کم‌تر از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر (دستگاه سنجش آمونیاک مارتینی مدل ۴۰۷ MI)

جیره غذایی (خوراک): از خوراک بچه‌ماهی شماره ۲ ماهیان دریایی ساخت شرکت بیضا فارس (پلت ۲-۱/۵ میلی‌متری، با ترکیب متوسط ۴۷٪ پروتئین خام، ۱۸٪ چربی خام، ۴۲۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم خوراک انرژی قابل هضم، ۲٪ فیبر خام، ۱۴٪ خاکستر، ۱/۱٪ فسفر کل و حداکثر رطوبت ۱۲٪) استفاده شد. به‌منظور آماده‌سازی جیره مخصوص هر یک از تیمارها، غذای مربوطه به کمک ترازوی دیجیتالی وزن شدند که پس از وزن کردن اجزای جیره، هر تیمار به صورت جداگانه، با هم مخلوط و با کمک هم‌زن برقی و به همراه روغن ماهی و آب خمیر مناسب تهیه شد. این پلت‌ها پس از پهن شدن بر روی تورهای آلومینیومی در سایه خشک شدند. غذاهای خشک شده پس از خرد شدن با دست درون ظروف پلاستیکی مخصوص نگه‌داری جیره ماهی ریخته شده و در محیطی خشک و خنک نگه‌داری شدند. در این تحقیق میزان دفعات تغذیه در ۴ نوبت و در ساعت‌های ۷، ۱۱، ۱۵ و ۱۹ بود. میزان غذادهی بر اساس وزن بدن ماهی انجام شد (۱۲).

تیماربندی آزمایش: تیمارهای مورد بررسی به قرار زیر بودند: تیمار اول: تغذیه با خوراک حاوی 10^8 CFU/gr لاکتوباسیلوس پلانتاروم در گرم خوراک (A)، تیمار دوم: تغذیه با خوراک حاوی یک درصد بتاگلوکان در هر گرم خوراک (B)، تیمار سوم: تغذیه با خوراک حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم 10^8 CFU/gr و یک درصد بتاگلوکان در هر گرم خوراک(C)، تیمار چهارم: گروه کنترل یا شاهد تغذیه با خوراک بدون افزودنی(D). طول دوره تحقیق بدون احتساب دو هفته سازگاری، هشت هفته بوده و در روزهای صفر، پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم ماهی‌ها بیومتری شده و آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی روده اندازه‌گیری شد هم‌چنین ۴ بار در روز و به‌میزان ۱۰ درصد وزن بدن بچه‌ماهیان غذادهی انجام شد (۲۰).

انجام مراحل نمونه‌گیری از دستگاه گوارشی: نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان، در روز صفر (اول شروع آزمایش) و ۶۰ انجام شد. ماهیان از هر تکرار را با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت گیرد. سپس بلافاصله در دمای ۱۹۶- سلسیوس (تانک ازت مایع) نگه داری شدند (۲۰) و نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از تانک ازت مایع

توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین 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 برروی نمونه ریخته شد و نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی هموژن شدند (۲۲، ۵۰).

سنجش آنزیم‌های گوارشی: برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول 50 mM، بافر Tris-Hcl2 mM در pH ۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی-حجمی استفاده و به‌مدت ۱ دقیقه در 10000 rpm سانتریفوژ شد (۴۲). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر، کلریدکلسیم M 1/0 به هموژن اضافه‌و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ و مایع رویی حاصله‌جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید. به‌علاوه‌برای‌ساخت بافر هموژن به‌منظور سنجش‌آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، کیموتریپسین، آلفا-آمیلاز و لیپاز)، Tris-Hcl Mm100، EDTA Mm0.1، Triton %1/0 X 100 در pH 8/7 ترکیب گردید. سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند، نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به‌داخل اپندورف‌ها ریخته شده و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (۴۲). فعالیت چهار آنزیم گوارشی آلفا-آمیلاز، تریپسین، لیپاز، فسفاتاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. برای‌تعیین‌فعالیت‌آنزیم‌ترپسین، از سوبسترای N- بنزوئیل -L-آرژنین اتیل استر (BAEE)استفاده گردید. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N- بنزوئیل -L-آرژنین تبدیل می‌شود. نتایج در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت نوری صورت گرفت (۲۴). ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا با ۵۷۰ میکرولیتر از اسیدکلریدریک 1 mM مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد نمونه به‌میزان ۳۰میکرولیتر از نمونه رقیق شده اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر) یونیکو مدل ۲۸۰۲ (UV) در‌طول موج ۲۵۳ نانومتر انجام شد. برای‌تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت‌رنگ در معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد (۳۲). ابتدا ۲۵۰میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایشی و ۲۵۰میکرولیتر آب مقطر نیز به لوله دیگری به‌عنوان شاهد وارد شد. سپس عمل انکوباسیون به‌مدت ۴-۳ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد تا به دمای تعادل برسند. سپس ۲۵۰میکرولیتر از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل انکوباسیون دقیقاً به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف رنگی دی نیتروسالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها از حمام خارج شده و در دمای اتاق خنک شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت‌نوری انجام شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم‌بر‌روی‌سوبسترا (نشاسته) به‌دست آمد.واحدفعالیت‌آلفا- آمیلاز، برحسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه‌شد (۹). برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington استفاده گردید (۵۳). در این روش از امولسیون روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر Tris-HclM8/0، محلول هیدروکسیدسدیم 50 mM و معرف تیمول فتالئین ٪۰/۹ استفاده شد. برای سنجش این آنزیم از کیت آلکالین فسفاتاز (.Ref:Zist Chem 10-503) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بیکربنات‌را‌با‌یک‌قسمت محلول معرف Para-nitrophenyl phosphate M 1/0 مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد تا هم‌دمایی صورت گیرد. میزان ml 5/0 از این مخلوط را با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار می‌دهیم تا انکوبه شود. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری‌شد. شاهدنیز مانندنمونه بالا آماده‌سازی‌شد با این تفاوت که محلول‌آنزیمی پس‌از افزودن‌محلول‌سود‌به‌لوله‌آزمایش‌اضافه شد.

شمارش جمعیت باکتریایی و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک: برای‌نمونه‌گیری، ۲۴ ساعت قبل از‌نمونه‌برداری، تغذیه ماهیان قطع، سپس۶ماهی‌از‌هر‌تکرار‌آسان‌کشی‌و به‌منظور از بین‌بردن‌باکتری‌های سطح بدن ماهیان، نمونه‌های ماهی‌در محلول بنزالکونیوم‌کلراید ۰/۹ درصد قرار گرفتند (۱۴) و مجددا توسط آب استریل شسته شدند. در ادامه سطح پشتی و شکمی آن‌ها با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و حفره شکمی با استفاده از اسکالپل استریل باز گردید. روده در حد فاصل ۰/۵ سانتی‌متر مانده قبل از لوله مارپیچی قطع و محتویات روده‌ای با مالش‌ملایم تیغ‌اسکالپل خارج شد. ۱ گرم از این محتویات روده در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی رقیق استریل و از نمونه فوق، رقت‌های متوالی ۱۰۲ تا ۱۰۵ تهیه و در ادامه نمونه‌بردای تحت شرایط استریل، حجمی معادل ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و به‌صورت سطحی در محیط کشت MRS Agar و TSA (به‌صورت هوازی و بی هوازی) به ترتیب برای شمارش لاکتوباسیلوس‌ها و شمارش کلی باکتریایی کشت‌داده شد(۵۳). پلیت‌های MRS به‌مدت ۴۸ساعت در

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی قرار داده شدند. پس از انکوباسیون، پرگنه‌ها شمارش و تعداد کل باکتری‌ها با احتساب رقت مورد استفاده مشخص گردید (۴۳) در پایان شمارش کلنی‌های تشکیل شده بر اساس لگاریتم واحد کلنی انجام شد (۷).

تجزیه و تحلیل آماری: برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید و تاثیر پروبیوتیک و پربیوتیک مورد بررسی، بر روی میزان آنزیم‌های گوارشی در ۴ تیمار ذکر شده، توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک و دو طرفه با ضریب اطمینان ۹۵ ٪ مورد مقایسه قرار گرفت. برای بررسی 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

نتایج فعالیت آنزیم‌های گوارشی: نتایج فعالیت آنزیم‌های گوارشی در شکل‌های ۱ تا ۶ آمده است.

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار B با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و بیش‌ترین میزان این آنزیم در این تیمار مشاهده گردید.

فعالیت آنزیم کیموتریپسین: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، میزان آنزیم کیموتریپسین در تمامی تیمارها در سطح یکنواختی قرار داشت.

فعالیت آنزیم تریپسین: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، تیمار C با کم‌ترین میزان فعالیت تریپسین که با تیماره A و D اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). هم‌چنین در روز ۶۰ تیمارهای B با سایر تیمارها دارای اختلاف چندانی نبود ودر حد واسط فعالیت آنزیم تریپسین قرار داشت.

فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، گروه کنترل با کم‌ترین میزان فعالیت آلفا آمیلاز که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت.

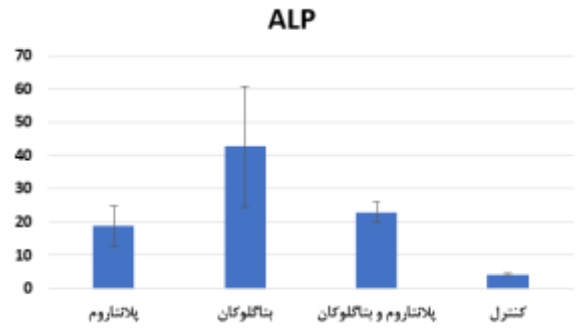
فعالیت آنزیم پروتئاز: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، تیمارهای تحت آزمایش (A,B,C) و اندازه‌گیری با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری نداشتند.

فعالیت آنزیم لیپاز: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۶۰ آزمایش، تیمارهای تحت آزمایش و اندازه‌گیری با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری نداشتند. فعالیت آنزیم‌ها (U/mg protein min^{-1}) در تیمارهای مختلف در روزهای ۰ و ۶۰ (انتهای دوره) آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم 10^8 تیمار B: تغذیه شده با خوراک حاوی یک درصد بتاگلوکان در هر کیلوگرم خوراک، تیمار C : تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم 10^8 و یک درصد بتاگلوکان در هر گرم خوراک (حروف غیرهمنام کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای نمونه‌گیری برای هر تیمار است.

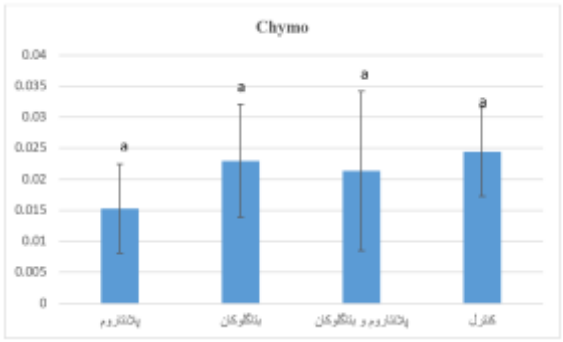
نتایج فلور میکروبی و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده: نتایج حاصل از مطالعه لاکتوباسیل‌های روده، در روزهای صفر و ۶۰ دوره پرورش، بین تیمارها اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری نشان داد (P<۰/۰۵) و به‌طور واضح تأثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر فلور باکتریایی روده مشاهده گردید. در این بررسی، از این نظر، تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد و سایر تیمارها در روز ۶۰ داشت (P<۰/۰۵). در بررسی شمارش کلی باکتری‌های محتوی روده تیمارهای تغذیه شده با پرو و پربیوتیک‌ها، اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین میزان باکتری‌های کل مربوط به گروه کنترل بود.

جدول ۱: مقایسه تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک (Mean ± SD) در بافت روده برای تیمارهای آزمایشی در روزهای مختلف نمونه‌گیری

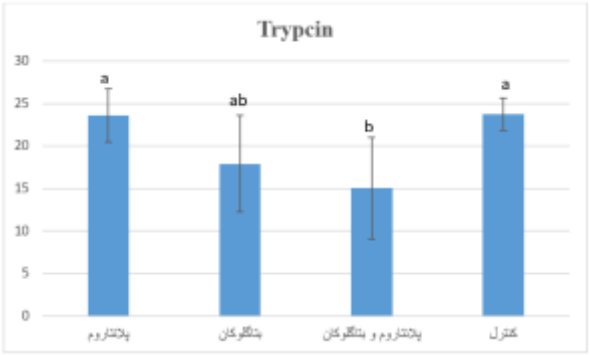
ازمایشات باکتریایی روده	تیمار	روز صفر	روز ۶۰
تعداد کل باکتری‌های روده 10^5×TSA	پلانتاروم	۱۳/۲۵±۲/۴	۱۹/۱۶±۲/۸۱^{ab}
	بتاگلوکان+پلانتاروم	۱۱/۲۵±۴/۱۳	۱۶/۸۳±۴/۷۴^{b}
	بتاگلوکان	۱۵/۸۳±۳/۳ ^{b}	۱۸/۲±۶/۵۳
	کنترل	۱۹/۳۳±۲/۰۸	۲۷±۸/۵۰^{a}
تعداد کل باکتری‌های اسید لاکتیک 10^2×MRS	پلانتاروم	۱/۳۳±۰/۵۷	۲۳/۶۶±۵/۰۸^{a}
	بتاگلوکان+پلانتاروم	۱±۰	۱۷/۵±۲/۸۸^{b}
	بتاگلوکان	۱/۵±۰/۷	۹/۲±۱/۴۸^{c}
	کنترل	۱/۲±۰/۴۴	۳/۲±۰/۵۴^{d}



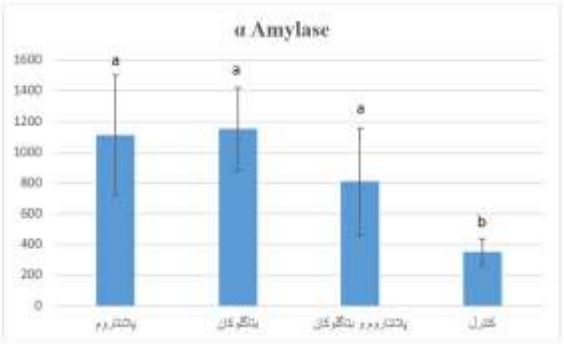
شکل ۱: نمودار اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز



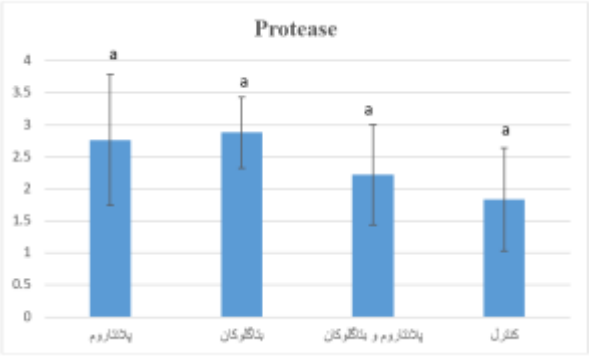
شکل ۲: نمودار اندازه‌گیری آنزیم کیموتریپسین



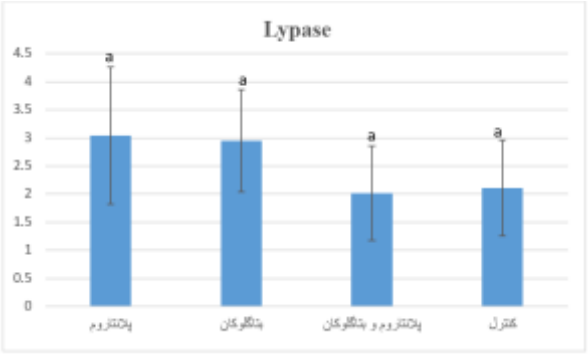
شکل ۳: نمودار اندازه‌گیری آنزیم تریپسین



شکل ۴: نمودار اندازه‌گیری آنزیم آلفا-آمیلاز



شکل ۵: نمودار اندازه‌گیری آنزیم پروتِئاز



شکل ۶: نمودار اندازه‌گیری آنزیم لیپاز

بحث

نتایج تحقیقاتی که در آن‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده شده، نشان داده است که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی ونشاسته موجود در غذا می‌شوند (۲۸)، لذا احتمالاً باکتری پروبیوتیکی آزمایشی (تیمار پلانتاروم) توانسته به این وسیله سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره خوراکی شوند. تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش ماهی کلمه (*Skrodenyte-Arbaciauskiene*)، شانک (۲۷) و هامور (۴۰)، گزارش‌شده است که همگی تأییدکننده نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم‌های گوارشی آلفا-آمیلاز و، تریپسین در شانک زرد باله می‌باشد. میزان آلکالین فسفاتاز روده در مطالعه حاضر در تیمار بتاگلوکان نشان داد که هضم مواد غذایی در انتروسیت‌ها به کمک این آنزیم می‌تواند افزایش یابد و از آن‌جایی که آلکالین فسفاتاز مسئول جذب بهتر چربی و کربوهیدرات است، درنهایت می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد گردد (۵۲). در این بررسی میزان آنزیم پروتئاز، کیمو تریپسین و لیپاز در ترکیب پلانتاروم+ بتاگلوکان در مقایسه با سایر تیمارها بیش‌تر بوده که احتمالاً گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانسته در گروه تغذیه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم و گروه پربیوتیک با پروبیوتیک (تیمار سوم)، اثر مثبت در تولید آنزیم‌ها و در نهایت در افزایش

فعالیت آنزیم‌های گوارشی داشته باشد. اگرچه لازم به توضیح می‌باشد که از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. همسو با نتایج حاضر، Sun و همکاران، گزارش کردند که فعالیت پروتئاز پانکراس هامور معمولی در روز ۶۰ تغذیه با لاکتوباسیلوس لاکتیس، افزایش یافت هر چند تغییر معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید (۴۸). Nasirpour و همکاران، تأثیر استفاده از سین‌بیوتیک با سطوح مختلف بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید به‌همراه لاکتوباسیلوس کازئی را بر فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد فعالیت آنزیم‌های تریپسین و پروتئاز، آلفا-آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز به‌طور قابل‌توجهی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته بود (۳۶). نتایج تحقیقاتی که در آن‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده شده، نشان داده است که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند، لذا احتمالاً باکتری پروبیوتیکی تحقیق حاضر توانسته‌اند به این وسیله سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌های موجود در جیره غذایی ماهی‌های گوشتخوار شوند. موارد مشابهی از توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش وجود دارد (۴۶، ۵۵)، که همگی تأییدکننده نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم‌های گوارشی آلفا-آمیلاز و تریپسین در شانک زرد باله می‌باشند. بررسی فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی شانک زرد باله تحت تاثیر پروبیوتیک و پریبیوتیک بتاگلوکان. مبنای افزایش تعداد باکتری‌های مفید روده، تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH روده می‌باشد که موجب توقف رشد پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش گردیده و با تحریک سیستم ایمنی آبزیان، مقاومت آن‌ها را علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل استرس‌زا به‌میزان معنی‌داری افزایش می‌دهد. دلایل این افزایش را می‌توان به‌از بین‌رفتن باکتری‌های دیگر به‌ویژه باکتری‌های مضر به‌وسیله باکتری‌های مفید پروبیوتیکی دانست، زیرا این جمعیت‌های میکروبی با آزاد کردن برخی مواد شیمیایی، بر سایر جمعیت‌ها میکروبی تاثیر گذاشته و رقابت برای جذب مواد شیمیایی یا انرژی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۰، ۵۴). تیمار مخمر ساکارومایسیس سرویزیه+پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید در مقایسه با شاهد و دو تیمار مخمر و تیمار پری‌بیوتیک مانان الیگو ساکارید به تنهایی، اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/05$) که نشان می‌دهد استفاده از سین‌بیوتیک در مقابل پری‌بیوتیک و پروبیوتیک به تنهایی کارایی بالاتری داشته است. بار میکروبی روده به‌شدت تحت تاثیر پری‌بیوتیک، پروبیوتیک و ترکیب هر دو با یکدیگر قرار گرفت به گونه‌ای که تعداد کل در تیمارها ترتیبی به صورت کنترل> لاکتو باسیلوس پلانتاروم> لاکتوباسیلوس پلانتاروم به همراه پری‌بیوتیک بتاگلوکان> پری‌بیوتیک بتاگلوکان و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیکی به صورت لاکتوباسیلوس پلانتاروم>لاکتوباسیلوس پلانتاروم به همراه پری بیوتیک بتاگلوکان>پری بیوتیک بتاگلوکان>کنترل نشان دادند ($P<0/05$). Schley و Field عنوان کردند که تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و اسیدلاکتیک ناشی از تخمیر پری‌بیوتیک منجر به کاهش pH روده گشته که شرایط مناسبی را برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک فراهم نموده و این امر افزایش شمارش باکتری‌های روده را تحت تاثیر لاکتوباسیلوس و پری‌بیوتیک تائید می‌کند. از طرفی بالاترین بودن میزان بار باکتریایی کل تولید شده در تیمار شاهد در مقایسه با سایر تیمارها را می‌توان به جایگزینی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی نسبت داد. این افزایش را می‌توان به از بین رفتن باکتری‌های مضر در اثر تخمیر بتاگلوکان در روده و در نتیجه تولید باکتری‌های مفید ازجمله باکتری‌های اسیدلاکتیک دانست که ترکیباتی همانند باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند اشاره کرد (۳۴). Momeni-Moghaddam و همکاران، تاثیر مانان الیگو ساکارید را بر روی بار میکروبی روده کپور معمولی مورد بررسی قرار دادند. در بررسی غیرهم‌سو با تحقیق حاضر تعداد کل باکتری‌های روده‌ای در تحت تاثیر میزان مانان‌الیگوساکارید قرار نگرفت، اما تعداد باکتری اسیدلاکتیک در ماهیانی که با جیره‌های حاوی مانان الیگو ساکارید تغذیه شده بودند به شکل معنی‌داری افزایش یافت که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (۳۴). در مطالعه Akter و همکاران، در تاثیر مکمل تغذیه‌ای مانان الیگوساکارید بر روی رشد گربه‌ماهیان جوان *Pangasianodon hypophthalmus* میزان بار باکتریایی اسیدلاکتیکی در مقایسه با شاهداختلاف معنی‌داری داشت که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (۸). جمعیت میکروبی روده ماهی شامل مجموعه پیچیده‌ای از انواع باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری می‌باشد (۴۱). فلور باکتریایی روده از باکتری‌های بومی (Indigenous)، موقت و گذرا (Transit) تشکیل شده است (۱۸). تحقیقات اخیر نشان داده است هر چند دستگاه گوارش ماهی اکوسیستمی متفاوت از آب محیط پرورش دارد اما روده ماهی‌ها فلور ثابت و پایداری ندارد. بررسی میکروبیوتای روده در مطالعه حاضر نشان داد که اگرچه تعداد کل باکتری‌های میکروبیوتای روده‌ای در تیمارهای پلنتاروم، بتاگلوکان و ترکیب پلانتاروم به همراه بتاگلوکان نسبت به اول دوره در تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش داشتند اما از نظر آماری تعداد کل باکتری میکروبیوتای روده‌ای در تیمار بتاگلوکان به‌تنهایی به‌صورت معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها می‌باشد. در مطالعه دیگری توسط Hoseinifar و همکاران، اثرات استفاده از سین‌بیوتیک گزینش‌شده ترکیبی از *P. acidilactici* و گالاکتوالیگوساکارید بر میکروبیوتای روده‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی گردید. نتایج ایشان برخلاف نتایج مطالعه حاضر، نشان

داد که بیش‌ترین میزان افزایش تعداد کل باکتری در تیمار سین‌بیوتیک بوده و اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با سایر تیمارها وجود داشت (۱۸). درخصوص باکتری‌های اسیدلاکتیک در گروه کنترل تعداد بسیار محدود کلنی جدا شد که از نظر آماری غیرقابل گزارش بود (کم‌تر از ۱۰ کلنی در رقت ۰/۱). این در حالی است که باکتری‌های اسید لاکتیک در انتهای دوره از سایر تیمارها جدا گردید. بیش‌ترین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک به‌تنهایی مشاهده شد. اگرچه بین تیمارهای پروبیوتیک و پربیوتیک از نظر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک تفاوت معنی‌داری وجود داشت و تعداد آن‌ها در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک بیش‌تر بود. در مطالعه حاضر مشاهده شد که بین استقرار باکتری در روده‌ها و تحریک پاسخ‌های ایمنی ماهی شانک زرد باله رابطه قوی وجود دارد. این یافته موافق مشاهدات سایر محققینی است که گزارش کرده‌اند لاکتوباسیلوس‌ها ازجمله لاکتوباسیلوس دلبروکئی تحت گونه بولگاریکوس، از توانایی خوبی جهت استقرار در مخاط روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۳)، روده ماهی کپور معمولی (۳۸) و روده انسان (۶، ۳۹) برخوردار است. هم‌چنین در مطالعه Bagheri و همکاران، تعداد باکتری‌های باسیلوس موجود در روده بچه‌ماهی قزل آلای رنگین‌کمان که با باکتری‌های باسیلوس به‌مدت دو ماه تغذیه شد، نشان دادند که تعداد باکتری‌های مذکور در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد بیش‌تر بود (۵). حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در روده بسیاری از ماهیان ازجمله ماهی کاد اقیانوس اطلس، ماهی آزاد اقیانوس اطلس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، فیل‌ماهی، قره‌برون، تیلاپیا و چارقطبی ثابت شده است، اما این باکتری‌ها جزء فلور غالب روده نیستند (۱۵، ۱۶). در جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از میکروفلور باکتریایی روده عواملی چون عدم وجود گلوکز در محیط کشت و نیز کندرشد بودن از عوامل دیگر محدودکننده در زمان بررسی باکتری‌های اسیدلاکتیک میکروبیوتای روده‌ای می‌باشد (۴۴). تلاش جهت افزایش تعداد و غالبیت باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق به‌کارگیری سویه‌های پروبیوتیکی عمدتاً منجر به تشکیل کلنی پایدار و غالب در میکروبیوتای روده‌ای نشده است (۳۷). دست یافتن به این مهم مستلزم استفاده از پربیوتیک به‌عنوان سوبسترا در یک ترکیب سین‌بیوتیکی است. در بررسی حاضر جمعیت لاکتوباسیل‌های روده ماهیان شانک زرد باله تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک پلانتاروم به‌تنهایی و پلانتاروم+بتا گلوکان و بتاگلوکان به‌تنهایی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند، به‌طوری‌که تیمار پلانتاروم بیش‌ترین میزان ماندگاری فلور باکتریایی را در بین تیمارهای آزمایشی داشت. در توجیه این یافته باید در نظر داشت که نفوذ به داخل لایه مخاطی ویژگی استقرار پروبیوتیک در روده‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از آن‌جایی که لایه مخاطی به‌طور مداوم در حال تجدید شدن است، ارگانیسم‌هایی که بتوانند عمیقاً در مخاط نفوذ کنند قادرند روی مخاط روده‌ها استقرار پیدا کنند. مطالعه Nikoskelainen و همکاران، نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با وجود آن که یک باکتری غیرمتحرک است می‌تواند به‌سرعت در لایه مخاطی نفوذ پیدا کند (۳۷). هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر، Abid و همکاران، اثرات استفاده از سین‌بیوتیک ترکیبی از *P. acidilactici* و فروکتوالیگوساکارید بر جمعیت میکروبی روده ماهی آزاد اقیانوس اطلس بررسی نمودند (۱). نتایج این مطالعه نشان داد تعداد کل باکتری روده در تیمار سین‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود. تعداد باکتری *P. acidilactici* در روده ماهیان تغذیه شده با سین‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود. در مطالعه Hoseinifar و همکاران، اثرات استفاده از سین‌بیوتیک گزینش شده ترکیبی از *P. acidilactici* و گالاکتوالیگوساکارید بر میکروبیوتای روده‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی گردید (۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد ماهی‌های تغذیه شده با سین‌بیوتیک بیش‌ترین میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک را در میکروبیوتای روده‌ای دارا بودند که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (۳۷). نتایج مطالعات فوق مشابه نتایج مطالعه حاضر بوده و موید تغییر در ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و تغییر آن به‌سمت باکتری‌های مفید است. افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌دلیل تأمین سوبسترای لازم جهت رشد در تیمار سین‌بیوتیکی است. این افزایش تعداد در میکروبیوتای روده‌ای موجب کاهش تعداد باکتری‌های بیماری‌زا و غیرمفید می‌شود که نهایتاً غالبیت پایدار باکتری‌های مفید را در میکروبیوتای روده‌ای به‌دنبال دارد به‌نظر می‌رسد که باکتری درون‌زاد لاکتوباسیلوس پلانتاروم به تنهایی توانسته سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتری‌های اسیدلاکتیکی ماهی شانک زرد باله را بهبود بخشد. ترکیب سین‌بیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌همراه بتاگلوکان ترکیب مناسب و ارتقادهنده سلامت ماهی شانک زرد باله نمی‌باشد اما به‌دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی و فیزیولوژیکی ماهی شانک زرد باله که تاکنون کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته و هم‌چنین عدم هم‌افزایی بتاگلوکان با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی مورد آزمایش، نیاز به آزمایشات بیش‌تر همراه با استفاده از پری بیوتیک‌های متفاوت‌تر از این آزمایش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره قرارداد پژوهانه: (scu.v1401.299) و قطب علمی ماهیان گرمابی، دانشگاه شهیدچمران اهواز و دانشگاه تهران تأمین شد. نویسندگان

این تحقیق از دستورالعمل‌های دانشگاهی تبعیت کردند و آزمایش‌ها را براساس دستورالعمل اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

منابع

1. **Abid, A.**, **Davies, S.J.**, **Waines, P.**, **Emery, M.**, **Castex, M.**, **Gioaccini, G.**, **Carnevali, O.**, **Bicherdike, R.**, **Romero, J. and Merrifield, D.L., 2013**. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish and Shellfish Immunology. 35(6): 1948-1956.
2. **Akrami, R., 2008.** Effect of probiotic mannan oligosaccharide in *Rutilus frisi kutum*. Master's thesis, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
3. **Akter, N.**, **Sutriana, A.**, **Talpur, A.H.R., 2015**. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish. Aquaculture. 24: 127-144
4. **Al-Dohail, M.A.**, **Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M., 2009**. Effects of the probiotic Lactobacillus acidophilus on the growth performance, haematological parameters, and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerlings. Aquaculture Research. 40: 1642-1652.
5. **Askarian, F.**, **Matinfar, A.**, **Kousha, A.**, **Bahmani, M.**, **Khorshidi, K.**, **Shenavar, A. and Ringo, E., 2008**. Diversity of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tracts of reared Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Fish Aquatic Sciences. 3: 302-311.
6. **Bagheri, T.**, **Hedayati, S.A.**, **Yavari, V.**, **Alizade, M. and Farzanfar, A., 2008**. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 8: 43-48.
7. **Bernfeld, P., 1951**. Methods in Enzymology, 3rd Edition. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., (eds). New York Acad Press. 149-157.
8. **Cahil, M., 1990**. Bacterial flora of fishes. Microbial Ecology. 19: 21-41.
9. **Cahu, C.L.**, **Zambonino Infante, J.L.**, **Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., 1999**. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Aquaculture. 171: 109-119.
10. **Calhau, C.**, **Martel, F.**, **Hipólito-Reis, C. and Azevedo, I., 2000**. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. Clinical Biochemistry. 33(7): 571-577.
11. **Cerezuela, R.**, **Meseguer, J. and Esteban, M., 2013**. Effect of inulin and Bacillus subtilis on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology. 34: 843-848.
12. **Dalmo, R.A.**, **Ingebrigtsen, K. and Bagwald, J., 1997**. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Fish Disease Journal. doi: 10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x
13. **Ellis, A.E., 1999**. Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology. 9(4): 291-308.
14. **Erlanger, B.F.**, **Kokowsky, N.C. and W., 1961**. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95: 271-278.
15. **Hagi, T.**, **Tanaka, D.**, **Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004**. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture. 234: 335-346.
16. **Hagi, T. and Hoshino, T., 2009**. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 73: 1479-1483.
17. **He, S.**, **Liu, W.**, **Zhou, Z.H.**, **Wei Mao, W.**, **Ren, P.**, **Marubashi, T. and Ringo, E., 2011**. Evaluation of probiotic strain Bacillus subtilis C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Research & Development. 1(1): 1-7. doi:10.4172/2155. 9546.S1-005
18. **Hoseinifar, S.H.**, **Mirvaghefi, A.**, **Amoozegar, M.A.**, **Sharifian, M. and Esteban, M.Á., 2015**. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. Fish & Shellfish Immunology. 45(1): 27-32.
19. **Firouzbakhsh, F.**, **Noori, F.**, **Khalesi, M.K. and Jani Khalili, K., 2011**. Effects of a probiotic, Protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. 37: 833-842. doi: 10.1007/ s10695-011-9481-4.
20. **Fuller, R., 1989**. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.
21. **Gibson, G.R.**, **Probert, H.M.**, **Van Loo, J.**, **Rastall, R.A. and Roberfroid, M., 2004**. Dietary modulation of the human colonic microbiota, updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews. 17: 259-275.
22. **Ghobadi, S.H.**, **Tavakoli, H. and Majazi Amiri, B., 2015**. Effects of probiotic Bactocell additives on the growth indices, survival, and body composition of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Development. 8: 77-87.
23. **Keysami, M.A.**, **Saad, C.R.**, **Daud, H.M.**, **Sijam, K. and Alimon, A.R., 2007**. Effect of Bacillus subtilis on growth development and survival of larva Macrobrachium rosenbergii (de Man). Aquaculture Nutrition. 13: 131-136.
24. **Kuz'mina, V.**, **Shekovtsova, N. and Bolobonina, V., 2010**. Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biological Bulletin. 37: 605-611.
25. **Li, P. and Galtin, D.M., 2004**. Evaluation of prebiotic GroBiotic TM AE and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture. 248: 197-205.
26. **Mahious, A.S.**, **Gatesoupe, F.J.**, **Hervi, M.**, **Metailler, R. and Ollevier, F., 2005**. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture International. 14: 219-229. doi: 10.1007/s10499-005-9003-4.
27. **Mahious, A.S. and Ollevier, F., 2005**. Probiotics and prebiotics in aquaculture. In: Proceedings of the 1st Regional Workshop on Technology to Enrich Live Food for Larviculture. 17-26 (Urmia, Iran).
28. **Makridis, P.**, **Bergh, Q.**, **Skjermo, J. and Vadstein, O., 2001**. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International. 9: 225-235.
29. **Martínez Cruz, P.**, **Ibáñez, A.L.**, **Monroy Hermosillo, O.A. and Ramírez Saad, H.C., 2012**. Use of probiotics in aquaculture. International Scholarly Research Network, ISRN Microbiology. 13 p.
30. **Merrifield, D.L.**, **Dimitroglou, A.**, **Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2009**. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology, and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Diseases. 32(9): 755-766.
31. **Mohammadian, T.,** Isolation and biochemical identification of potentially probiotic bacteria from Barbus grypus intestine. Iranian Veterinary Journal. 10(2): 88-97. (In Persian)
32. **Mohammadian, T.**, **Alishahi, M.**, **Tabandeh, M.**, **Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D., 2017**. Effect of oral administration of different concentrations Lactobacillus acidophilus on growth performance and digestive enzyme rainbow trout fish (*Oncorhynchus mykiss*) in the face of lead toxicity in the diet. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 16(1): 296-317.
33. **Mohammadian, T.**, **Nasirpour, M.**, **Tabandeh, M.R. and Mesbah, M., 2019**. Synbiotic effects of β-glucan, mannan oligosaccharide, and Lactobacillus casei on growth performance, intestine enzyme activities, immune-hematological parameters, and immune-related

gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) under experimental infection. Aquaculture. 511: 634197.

34. **Momeni-Moghaddam, P.**, **Keyvanshokooh, S. and Saeed Ziaei-Nejad, 2015**. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses, and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. National Library of Medicine. 6(3): 239-244.

35. **Mulder, I.E.**, **Wadsworth, S. and Secombes, C., 2007**. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with Aeromonas salmonicida. Fish & Shellfish Immunology. 23(4): 747-759.

36. **Nasirpour, M., Mohammadian, T., Tabandeh, M.R. and Mesbah, M., 2017.** Effect of synbiotic with different levels of β-glucan and mannan oligosaccharide with *Lactobacillus casei* on some gastrointestinal enzyme activity of *Cyprinus carpio*. Journal of Animal Environmental. 8(4): 179-188. (In Persian)

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

38. **Ouwehand, A.C.**, **Tolkko, S.**, **Kulmala, J.**, **Salminen, S. and Salminen, E., 2000**. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. Letters in Applied Microbiology. 31: 82-86.

39. **Ouwehand, A.C.**, **Niemi, P. and Salminen, S., 1999**. The normal fecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. FEMS Microbiology Letters. 177: 35-38.

40. **Peter, H. and Sneath, A., 1986**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1104-1154.

41. **Ringo, E.**, **Birkbeck, T.H.**, **Munro, P.O.**, **Vadstein, O. and Hjelmeland, K., 1996**. The effect of early exposure to Vibrio pelagius on the aerobic bacterial flora of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Applied Bacteriology. 81: 207-211.

42. **Rodriguez-Estrada, U.**, **Satoh, S.**, **Haga, Y.**, **Fushimi, H. and S.J., 2013**. Effects of inactivated Enterococcus faecalis and mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity, and disease protection in rainbow trout. Aquaculture. 75: 416-428.

43. **Rungruangsak-Torrissen, K., 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. 82: 644-654.

44. **Rurangwa, E.**, **Laranja, J.L.**, **Van Houdt, R.**, **Delaedt, Y.**, **Geraylou, Z. and Van de Wiele, T., 2009**. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria monocultures in vitro. Applied Microbiology. 106: 932-940.

45. **Soleimani, N.**, **Hoseinifar, S.H.**, **Merrifield, D.L.**, **Barati, M. and Abadi, Z.H., 2013**. Dietary supplementation of Fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities, and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish & Shellfish Immunology. 32: 316-321.

46. **Son, V.M.**, **Chang, C.C.**, **Wu, M.C.**, **Guu, Y.K.**, **Chiu, C.H. and Cheng, W., 2009**. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides. Fish & Shellfish Immunology. 26: 691-698.

47. **Song, Z.F.**, **Wu, T.X.**, **Cai, L.S.**, **Zhang, L.J. and Zheng, X., 2006**. Aquaculture research & development. Journal of Zhejiang University Science B. 7: 596-602.

48. **Sun, Y.Z.**, **Yang, H.L.**, **Ma, R.L.**, **Song, K. and Li, J.S., 2012**. Effect of *Lactococcus lactis* and Enterococcus faecium on growth performance, digestive enzymes, and immune response of grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture Nutrition. 18(3): 281-289.

49. **Suzer, C.**, **Çoban, D.**, **Kamaci, H.O.**, **Saka, Ş.**, **Firat, K.**, **Otgucuoğlu, Ö. and Küçüksari, H., 2008**. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. 280(1-4): 140-145.

50. **Vahabnezhad, A.**, **Taghavimotlagh, S. and Ghodrati Shojaei, M., 2017**. Growth pattern and reproductive biology of *Acanthopagrus arabicus* from the Persian Gulf. Surveys in Fish Sciences. 4(1): 18-28.

51. **Wang, Y.B.**, **Li, J.R. and Lin, J., 2008**. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture. 281 (1-4): 1-4.

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

53. **Worthington, C.C., 1991**. Worthington Manual Related Biochemistry, 3rd ed. Freehold, New Jersey. 80-85.

54. **Zhang, C.N.**, **Li, X.F.**, **Xu, W.N.**, **Jiang, G.Z.**, **Lu, K.L.**, **Wang, L.N. and Liu, W.B., 2013**. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability, and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish & Shellfish Immunology. 35: 1380-1386.

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