

# تأثیر استفاده توام نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر شاخص های رشد و تجمع پروبیوتیک در روده ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ناصر محمدی<sup>۱</sup> امیر توکمه چی<sup>۲\*</sup>

۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران

۲) گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده آرمیا و آبریان دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران

(دریافت مقاله: ۸ آبان ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۷ دی ماه ۱۳۹۳)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** در حال حاضر استفاده از ترکیبات طبیعی برای تقویت رشد و ایمنی در آبزیان از اهمیت به سزایی برخوردار است. **هدف:** در این مطالعه، اثرات استفاده خوراکی توام نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر شاخص های رشد و فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلاهی رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** برای این منظور تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با میانگین وزنی  $12 \pm 0.49$ g تهیه و پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاه به شش گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، گروه دوم با غذای تجاری مکمل سازی شده با پروبیوتیک CFU (*Lactobacillus casei*)<sup>۱۰</sup> در هر گرم غذا، گروه های سوم و چهارم به ترتیب با غذای حاوی  $50 \mu\text{g/kg}$  و  $100 \mu\text{g/kg}$  از نانو ذرات آهن (با قطر ۵۰nm) و گروه های پنجم و ششم نیز به ترتیب با  $50 \mu\text{g/kg}$  و  $100 \mu\text{g/kg}$  از نانو ذرات آهن به همراه CFU<sup>۱۰</sup> پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در هر گرم غذا تغذیه شدند. زیست سنجی و بررسی باکتری شناسی روده ماهیان در زمان های صفر و ۶۰ مطالعه انجام گرفت. **نتایج:** یافته های حاصل نشان داد شاخص های رشد (شامل وزن اکتسابی، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، نرخ رشد روزانه، شاخص بدنی و ضریب تبدیل غذایی) در ماهیانی که با غذای تجاری حاوی  $50 \mu\text{g/kg}$  از نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در هر کیلو گرم تغذیه شده بودند به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) بیشتر از سایر گروه ها بود. همچنین شمارش تعداد پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در محتویات روده ماهیان نشان داد که همراه کردن نانو ذرات آهن با پروبیوتیک سبب افزایش تراکم باکتری در روده ماهیان می گردد، طوریکه ماهیان تغذیه شده با  $100 \mu\text{g/kg}$  از نانو ذرات آهن و پروبیوتیک دارای بیشترین تعداد باکتری بودند. **نتیجه گیری نهایی:** از نتایج به دست آمده می توان نتیجه گیری کرد مکمل سازی غذای ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* می تواند اثرات معنی داری بر شاخص های رشد و تغذیه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان بگذارد. با این وجود جهت دستیابی به نتایج مطمئن انجام مطالعات میدانی ضروری است.

**واژه های کلیدی:** شاخص های رشد، نانو ذرات آهن، *Lactobacillus casei*، قزل آلاهی رنگین کمان

ایجاد مقاومت در باکتری ها، مشکلات بهداشت عمومی، ایجاد حساسیت در انسان و آلودگی های زیست محیطی، اغلب توصیه نمی شود. در این راستا استفاده از ترکیبات طبیعی نظیر پروبیوتیک ها به منظور افزایش رشد، درمان یا پیشگیری از بیماری های عفونی به عنوان جایگزین مناسب ترکیبات ضد میکروبی مطرح است (۲).

پروبیوتیک ها مکمل های غذایی میکروبی زنده ای هستند که با بهبود بخشیدن به تعادل میکروبی روده میزبان، اثرات سودمندی بر سلامتی آن دارند (۱۰). تکمیل سازی جیره غذایی با باکتری های پروبیوتیک به صورت فرآورده های میکروبی تجاری و یا باکتری های جدا شده از دستگاه گوارش آبزیان باعث افزایش رشد و بهبود کارایی تغذیه می گردد (۳۳). پروبیوتیک ها با دارا بودن فعالیت های متابولیک متنوع نظیر آمیلولیتیک، سلولولیتیک، پروتئولیتیک و لیپولیتیک و ترشح آنزیم های خارج سلولی سبب افزایش ضریب تبدیل غذایی، بهبود هضم پروتئین ها و کیفیت لاشه در آبزیان می شوند (۴). برای مثال محققان از باکتری *Lactobacillus casei* جهت افزایش رشد، تقویت سیستم

## مقدمه

امروزه توسعه آبرزی پروری در دنیا از اهمیت بالایی برخوردار است. تجارب کشورهای مختلف نشان می دهد که آبرزی پروری می تواند کمک قابل توجهی به تأمین غذای جمعیت رو به رشد کره زمین و به خصوص کشورهای در حال توسعه نماید. این فعالیت در چند دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و در حال رشد تبدیل شده است. در سال ۲۰۱۱، مزارع پرورش ماهی در خشکی رشد ۶/۲٪ داشته و تولید ماهی در آنها به ۴۴/۳ میلیون تن رسیده، در صورتی که مزارع پرورش ماهی دریایی رشد ۶/۶ درصدی داشته و تولید ماهی آنها برابر با ۱۹/۳ میلیون تن بوده است. پروتئین ماهی از نظر اسیدهای آمینه ضروری غنی است و به عنوان پروتئین مرغوب رتبه بندی می شود (۹).

در حال حاضر جهت تحریک رشد و درمان بیماری های عفونی در آبزیان از ترکیبات ضد میکروبی به طور گسترده ای در سطح جهان استفاده می شود. اما استفاده از آنتی بیوتیک ها به دلیل محدودیت هایی از قبیل



ماهیان در بدو ورود با محلول ۳٪ آب نمک به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده و سپس به مدت ۷ روز جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه در حوضچه ۱۰۰۰L از جنس فایبرگلاس نگهداری شدند. پس از اتمام دوره سازش، ماهیان به صورت تصادفی به شش گروه تقسیم شدند. هر گروه دارای سه تکرار بوده و پرورش در حوضچه‌های ۳۰۰L از جنس پلی اتیلن و با تراکم ۴۰ قطعه در هر حوضچه صورت گرفت. آب مورد نیاز از یک حلقه چاه عمیق تأمین و در تمام دوره تحقیق از سیستم جریان باز و هوادهی به کمک سنگ هوا برای پرورش ماهیان استفاده شد. در طول آزمایش دما، pH، آمونیاک و نیتريت به طور روزانه اندازه‌گیری شد.

**تهیه *Lactobacillus casei* و نانوذرات آهن:** باکتری مورد مطالعه که قبلاً از روده ماهی کپور معمولی جدا شده بود (۲۶) از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرتمیا و آبیان دانشگاه ارومیه تهیه و جهت رشد از محیط کشت آبگوشت MRS (مرک، آلمان) استفاده شد. پس از رشد، محیط حاوی باکتری سانتریفیوژ (با گردش ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C) گردید و رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشوداده شد. سپس تراکم آن به کمک سرم فیزیولوژی استریل و لوله‌های استاندارد مک فارلند برابر با  $10^8$  CFU/mL تنظیم گردید. همچنین نانوذرات مورد استفاده به صورت پودر قرمز رنگ و با قطر ۵۰nm از شرکت پیشگامان نانوایران (مشهد، ایران) تهیه گردید. لازم به ذکر است که اندازه نانوذرات با استفاده از میکروسکپ الکترونی نگاره (فیلپس، هلند) تأیید شد. در این مطالعه، گروه‌های تغذیه‌ای به شرح ذیل بودند:

گروه اول: غذای تجاری (فراوانه، ایران؛ جدول ۱) بدون افزودن هرگونه نانوذرات آهن و پروبیوتیک (تیمار شاهد)، گروه دوم: غذای تجاری حاوی پروبیوتیک CFU (*Lactobacillus casei*)  $10^8$  در هر گرم، گروه سوم: غذای تجاری حاوی  $50 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن در هر کیلوگرم غذا، گروه چهارم: غذای تجاری حاوی  $100 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن در هر کیلوگرم غذا، گروه پنجم: غذای تجاری حاوی  $50 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک در هر کیلوگرم و گروه ششم: غذای تجاری حاوی  $100 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک در هر کیلوگرم غذای تجاری.

**تهیه غذا و غذا دهی:** جهت افزودن پروبیوتیک و نانوذرات آهن به غذا ابتدا غذای تجاری به وسیله آسیاب به حالت پودر درآمده، سپس مقادیر مورد نیاز از نانوذرات در سرم فیزیولوژی استریل به حالت سوسپانسیون درآمده و به غذا اضافه گردید. در مرحله بعد مخلوط آماده به کمک چرخ‌گوشت به صورت پلت درآمده و اجازه داده شد غذا در محل تمیز به مدت ۲۴ ساعت خشک گردد. همچنین باکتری *Lactobacillus casei* با تراکم  $10^8$  CFU به ازای هر گرم غذا اسپری و اجازه داده شد نمونه غذا به مدت دو ساعت در دمای اتاق خشک گردد. غذاهای حاوی پروبیوتیک هر سه روز یک بار تهیه و در ظروف پلاستیکی درب بسته در داخل یخچال (دمای ۴°C) نگهداری شدند. غذاهای ماهیان بر اساس دمای آب، توده

ایمنی و بهبود مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عوامل تنش‌زا و بیماری استفاده کردند (۲۷). اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و تحریک اشتها (۱۸)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش رشد (۲۳)، همچنین افزایش کیفیت آب و افزایش بقای موجود می‌شوند (۲۴).

فناوری نانو عبارات است از ساخت مواد در ابعاد بین ۱nm تا ۱۰۰ که می‌توانند خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی منحصر به فردی با کاربردهای جدید داشته باشند (۱۹). گفته می‌شود که دانش نانو تکنولوژی می‌تواند تحول بزرگی در صنعت آبرزی پروری با ارائه روش‌های نوین در حوزه‌های زیست فناوری، ژنتیک، تکثیر و پرورش و بهداشتی ایجاد نماید. برای مثال می‌توان افزایش توانایی ماهی در جذب داروها، انتقال ژن‌ها و هورمون‌ها، مواد مغذی و غیره را نام برد (۲۸). آهن به عنوان یک ریز مغذی نقش مهمی در عملکرد اندام‌ها و بافت‌های حیوانات، از جمله ماهیان دارد (۱). برای مثال آهن نقش مهمی در حمل و نقل اکسیژن، تنفس سلولی و واکنش‌های اکسیداسیون چربی به عهده دارد (۲۰). همچنین آهن یکی از عناصر ریز مغذی ضروری برای سیستم ایمنی بدن و دفاع در برابر عفونت‌های مختلف به شمار می‌رود (۶).

خواص فیزیکی شیمیایی منحصر به فردی که در نانوذرات اکسید آهن وجود دارد می‌تواند پتانسیل بالایی در کاربردهای زیست پزشکی، مکمل‌های غذایی، مواد افزودنی ضد میکروبی و دارورسانی داشته باشد (۱۷). اخیراً، گزارش‌های اولیه نشان داده است که نانوذرات اکسید آهن می‌تواند قابلیت در دسترس بودن آهن را نسبت به دیگر اشکال آهن در انسان و موش افزایش دهند. علاوه بر آن آهن با مقدار پروتئین، در بافت‌های حیوانی در ارتباط است (۵). در یک بررسی مشخص شد که افزودن نانوذرات آهن به جیره غذایی ماهی کپور معمولی و ماهیان خاویاری جوان نرخ رشد آنها به ترتیب ۳۰ و ۲۴٪ افزایش پیدا می‌کند (۲۸). همچنین استفاده توأم آهن و پروبیوتیک در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش تعداد گلوبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون می‌شود (۲۷). با توجه به اینکه مطالعات اندکی پیرامون تأثیر نانوذرات آهن بر میزان رشد باکتری و در نهایت میزبان اصلی وجود دارد، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر استفاده توأم نانوذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر رشد و فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

## مواد و روش کار

**تهیه ماهی و طراحی آزمایش:** تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $112 \pm 0.49$ g از یکی از مزارع پرورش ماهی تهیه و به کمک تانکر مجهز به سیستم اکسیژن به آزمایشگاه منتقل شدند.



## نتایج

کشت غذاهای مکمل سازی شده با *Lactobacillus casei* بر روی محیط کشت اختصاصی MRS و وجود این باکتری را در غذا ثابت نمود. چنانچه نتایج آزمایش نشان داد که هر گرم غذای گروه‌های آزمایشی به طور متوسط حاوی  $9/3 \times 10^7$  CFU باکتری *Lactobacillus casei* بود همچنین کشت غذای تجاری (گروه شاهد) نشان داد که فاقد هر گونه پروبیوتیک *Lactobacillus* است.

جدول ۲ نتایج شاخص‌های رشد و تغذیه ماهیان گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. برای اساس میانگین وزن اکتسابی ( $53/17 \pm 5/89$ g) در ماهیان تغذیه شده با  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک (گروه پنج) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بوده و اختلاف آماری معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با ماهیان شاهد نشان داد. به همین ترتیب میانگین درصد افزایش وزن بدن ( $415/5 \pm 49/9$ g) و نرخ رشد ویژه ( $3/63 \pm 0/2$ ٪) در ماهیان تغذیه شده با  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک (گروه پنج) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بوده و اختلاف آماری معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با ماهیان شاهد داشت. میانگین نرخ رشد روزانه در ماهیان تغذیه شده با  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک (گروه شش) نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بوده و اختلاف آماری معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با ماهیان شاهد نشان داد. میانگین فاکتور وضعیت در ماهیان گروه‌های سه ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  نانوذرات آهن)، چهار ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  نانوذرات آهن)، پنج و پروبیوتیک) تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد، اما همه این گروه‌ها با ماهیان شاهد و ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0/05$  بودند.

همچنین در بررسی حاضر تأثیر همراه کردن نانوذرات آهن با باکتری *Lactobacillus casei* بر مقدار پروبیوتیک در روده ماهی قزل آلا رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده نشان داد که تراکم باکتری بسته به غلظت نانوذرات آهن استفاده شده، در هر گرم از محتویات روده افزایش یافت (جدول ۳). به طور مشخص در طول مطالعه هیچ گونه پروبیوتیکی از روده ماهیان شاهد و گروه‌های سوم ( $50 \mu\text{g}$ ) نانوذرات آهن در کیلو) و چهارم ( $100 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن در کیلو) جدا نشد، اما در گروه‌های دوم (تغذیه شده با  $50 \mu\text{g}$  نانوذرات آهن در کیلو به تنهایی)، پنجم ( $50 \mu\text{g}$  نانوذره و پروبیوتیک) و ششم ( $100 \mu\text{g}$  نانوذره و پروبیوتیک)

جدول ۱. آنالیز تقریبی غذای تجاری پلت (درصد) مورد استفاده در این تحقیق.

جزء	GFT 1	GFT 2
پروتئین خام	۳۶	۳۸
چربی خام	۱۴	۱۴
خاکستر	۱۰	۱۰
فیبر	۴	۴
فسفر	۱	۱/۱
رطوبت	۱۱	۱۱

بدنی و توصیه کارخانه خوراک و سه وعده در روز (ساعات ۹، ۱۳ و ۱۹) انجام گرفت، همچنین لازم به توضیح است که طول دوره پرورش ۶۰ روز در نظر گرفته شد.

زیست سنجی ماهی: زیست سنجی ماهیان در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دوره تحقیق انجام گرفت و برای این کار از هر تیمار تعداد ۱۵ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و پس از توزین و اندازه‌گیری طول کل، فاکتورهای رشد و تغذیه شامل وزن اکتسابی (Weight Gain)، نرخ رشد روزانه (Daily Growth Rate)، درصد افزایش وزن بدن (Body Weight Gain)، نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate)، فاکتور بدنی (Condition Factor) و ضریب تبدیل غذا (Food Conversion Rate) به کمک معادله‌های زیر محاسبه شدند ( $3,14,16$ ):

(وزن اولیه - وزن نهایی) = وزن اکتسابی (g)

طول دوره پرورش / (وزن اولیه - وزن نهایی) = نرخ رشد روزانه (g)

$100 \times$  [میانگین وزن اولیه به گرم - میانگین وزن اولیه به گرم - گرم]

میانگین وزن نهایی به گرم] = درصد افزایش وزن بدن (٪)

$100 \times$  [طول دوره پرورش  $\div$  لگاریتم میانگین وزن اولیه به گرم -

لگاریتم میانگین وزن نهایی به گرم] = نرخ رشد ویژه (٪)

$100 \times$  [میانگین طول نهایی به سانتی متر)  $\div$  میانگین وزن نهایی به

گرم] = فاکتور بدنی (٪)

وزن اکتسابی / غذای داده شده = ضریب تبدیل غذا

بررسی باکتری شناسی محتویات روده: بررسی‌های باکتری شناختی

محتویات روده ماهیان در دوره سازگاری و هر ۱۵ روز یکبار صورت گرفت. برای این منظور تعداد ۵ قطعه ماهی به صورت تصادفی از هر تکرار (۱۵ قطعه به ازاء هر تیمار) تهیه و ابتدا با زدن ضربه به سر آسان کشی شده و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. سپس در شرایط استریل پس از ضد عفونی سطح بدن با الکل  $96^0$ ، خط میانی شکم با اسکالپل استریل شکافته شده و در شرایط استریل محتویات روده‌ها از ابتدای روده‌ها تا ۱ سانتی متری سوراخ مخرج جمع‌آوری و توزین گردید. سپس از محتویات روده رقت سریال ( $10^1 - 10^8$ ) در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و شمارش تعداد باکتری روی محیط MRS آگار انجام گرفت. در ضمن تعداد باکتری‌های شمارش شده بر حسب CFU/g در محتویات روده گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز

واریانس دو طرفه (ANOVA)، نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.



جدول ۲. شاخص‌های رشد ماهیان تغذیه شده با نانوذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* به مدت ۶۰ روز. اعداد به صورت Mean  $\pm$  Standard Deviation بیان شده است. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح  $p < 0.05$  می باشد.

وزن اکتسابی (g)	نرخ رشد روزانه (g)	درصد افزایش وزن بدن (%)	نرخ رشد ویژه (%)	فاکتور بدنی (%)
شاهد	۰/۸۲ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>c</sup>	۲۶۹/۹ $\pm$ ۲۶/۷ <sup>c</sup>	۳/۰۵ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>b</sup>	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>
پروبیوتیک	۱/۰۲ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>b</sup>	۳۶۷/۸ $\pm$ ۵۲/۴ <sup>b</sup>	۳/۴۱ $\pm$ ۰/۲۴ <sup>a</sup>	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>a</sup>
نانوذره ۵۰	۰/۹۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>bc</sup>	۳۵۲/۵ $\pm$ ۳۶/۱ <sup>b</sup>	۳/۳۴ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>
نانوذره ۱۰۰	۱/۳۷ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۴۰۲/۷ $\pm$ ۴۱/۳ <sup>a</sup>	۳/۵۸ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>
پروبیوتیک و نانوذره ۵۰	۱/۱۸ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۴۱۵/۵ $\pm$ ۴۹/۹ <sup>a</sup>	۳/۶۳ $\pm$ ۰/۲ <sup>a</sup>	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>
پروبیوتیک و نانوذره ۱۰۰	۱/۱۴ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۴۰۳ $\pm$ ۴۷ <sup>a</sup>	۳/۵۸ $\pm$ ۰/۲ <sup>a</sup>	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>

جدول ۳. نتایج شمارش تعداد (CFU/g) پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در محتویات روده ماهیان گروه‌های مختلف در زمان‌های متفاوت.

گروه	دوره سازگاری	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
شاهد	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد
پروبیوتیک	دیده نشد	۸/۱ $\times 10^2$	۵/۲ $\times 10^2$	۸/۹ $\times 10^2$
نانوذره ۵۰	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد
نانوذره ۱۰۰	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد	دیده نشد
پروبیوتیک و نانوذره ۵۰	دیده نشد	۵/۴ $\times 10^4$	۷/۴ $\times 10^5$	۲/۸ $\times 10^3$
پروبیوتیک و نانوذره ۱۰۰	دیده نشد	۳/۲ $\times 10^5$	۴/۲ $\times 10^6$	۷/۶ $\times 10^4$

بالفاصله *Lactobacillus casei* از محتویات روده ماهیان جدا شده و بیشترین میزان آن در ماهیان گروه شش (۱۰۰  $\mu$ g) نانوذره و پروبیوتیک و در روز ۴۵ مطالعه مشاهده گردید.

## بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن *Lactobacillus casei* به صورت ترکیب با نانوذرات آهن به جیره به طور معنی داری باعث بهبود شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. به طور مشخص ماهیان تغذیه شده با غذای تکمیل شده با ۵۰  $\mu$ g نانوذرات آهن در هر کیلوگرم به همراه (CFU/g *Lactobacillus casei*)<sup>۱۰</sup> دارای شاخص‌های رشد بهتری نسبت به ماهیان شاهد بودند.

پروبیوتیک‌ها با تحریک اشتها سبب بهبود فاکتورهای رشد در موجودات مصرف کننده آنها می‌شوند. محققان نشان دادند افزودن پروبیوتیک‌ها به غذای ماهی باعث افزایش فعالیت گوارشی، آنزیمی و تحریک اشتها شده و در نهایت سبب بهبود رشد می‌گردند (۱۸). ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش رشد، توسعه سطوح غذا (۲۱) و همچنین افزایش کیفیت آب و افزایش بقای موجود می‌شوند. بررسی‌های اخیر ثابت کرد پروبیوتیک‌ها با تولید ویتامین‌ها، تولید ترکیبات سم زدا در جیره غذایی و تجزیه ذرات غیر قابل هضم موجب تحریک اشتها و بهبود تغذیه در میزبان می‌گردند (۲۹). تکمیل جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پروبیوتیک‌ها در افزایش ضریب کارایی غذایی و کاهش ضریب تبدیل غذایی، تعادل

میکروبی روده و سلامتی و بازماندگی مؤثر است (۲۱).

در بررسی حاضر تکمیل جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* به میزان  $10^8$  CFU در هر گرم غذا، سبب بهبود شاخص‌های رشد گردید، که این یافته با نتایج تحقیقات Douillet و Langdon در سال ۱۹۸۸، Gatesoupe در سال ۱۹۹۸، Gomez-Gill و همکاران در سال ۲۰۰۰، Merrifield و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد (۸، ۱۲، ۱۳، ۲۱، ۲۳). بهبود شاخص‌های رشد به ویژه در ماهیانی چشمگیر بود که علاوه بر پروبیوتیک نانوذرات آهن را نیز دریافت کرده بودند. این یافته ثابت می‌کند که نانوذرات آهن اثر پروبیوتیک را بر بهبود شاخص‌های رشد تقویت می‌کند. به عبارتی یکی از عوامل افزایش شاخص‌های رشد و کاهش ضریب تبدیل غذا در تیمارهای تغذیه شده با نانوذرات آهن و پروبیوتیک می‌تواند اثرات مثبت نانوذرات آهن به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر هضم و جذب غذا باشد. با توجه به اینکه آهن اهمیت و نقش به‌سزایی در رشد باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها در بدن میزبان به عهده دارد (۳۱)، لذا می‌تواند رشد و تکثیر پروبیوتیک را در روده تقویت نماید.

البته لازم به توضیح است که افزودن مقادیر کافی آهن به جیره خود به تنهایی می‌تواند علت دیگر افزایش رشد باشد. بررسی مطالعات دیگران نشان داد که افزایش سطح آهن در جیره غذایی ماهی سبب تقویت رشد و افزایش وزن ماهی می‌گردد (۲۹). به طور تجربی حذف آهن از جیره غذایی ماهی آزاد ماهی اقیانوس اطلس سبب کاهش رشد و افزایش تلفات خواهد شد (۱۱). همچنین بررسی‌های صورت گرفته پیرامون افزودن نانوذرات آهن به جیره به طور چشمگیری سبب کاهش مرگ و میر ماهی کپور معمولی و ماهیان خاویاری می‌شود (۲۵). بکار بردن سطوح مختلف نانوذرات آهن در رژیم غذایی این ماهیان در مقایسه با سایر منابع آهن حاکی از بهبود رشد می‌باشد. نتایج تحقیقات Behra و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهد که نانوذرات آهن به طور قابل توجهی سبب افزایش جذب و در دسترس بودن زیستی آهن در ماهی می‌شود (۶). با توجه به نتایج حاصل از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که تکمیل جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با مقادیر ۵۰ و ۱۰۰  $\mu$ g نانوذرات آهن به‌ازاء هر



## References

- Andersen, F., Lorentzen, M., Waagbo, R., Maage, A. (1997) Bioavail-ability and interactions with other micronutrients of three dietary iron sources in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolts. *Aquacult Nutr.* 3: 239-346.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I., Griffith, D.R.W. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis.* 18: 93-96.
- Austreng, E. (1978) Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture.* 13: 265-272.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. (2002) Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquacult Int.* 10: 109-121.
- Barton, J.C, Edwards, C.Q. (2000) Hemochromatosis: Genetics, Patho-physiology, Diagnosis and Treatment. (1<sup>st</sup> ed.). Cambridge University Press, New York, USA.
- Behera, T., Swain, P., Rangacharulu, M., Samant, M. (2013) Samant Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. *Appl Nanosci.* 1: 1-8.
- Bhaskaram, P. (1988) Immunology of iron deficient subjects. In: Nutrition and Immunology. Chandra, R.K. (ed.). (1<sup>st</sup> ed.) Alan, R. Liss, WB. Saunders Company. Philadelphia, USA. p. 149-168.
- Douillet, P.A., Langdon, C.J. (1994) Use of a probiotic for the culture of pacific oyster (*Crassostrea gigas*, thunberg). *Aquaculture.* 199: 25-40.
- FAO. (2011) FAO Fisheries and Aquaculture Department has Published the Global Aquaculture Production Statistics. Rome, Italy.
- Fuller, R. (1989) A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gatlin, D.M., Wilson, R.P. (1986) Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture.* 52:191-198.
- Gatesoupe, F.J. (1998) Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* spp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat Living Resour.* 10: 239-246.
- Gomez-Gill, B., Rouque, A., Turnbull, J.F. (2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larva aquatic organisms. *Aquaculture.* 191: 259-270.
- Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., Hemre, G.I. (2005) Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquacult Nutr.* 11: 301-313.
- Hilty, F.M., Arnold, M., Hilbe, M., Teleki, A., Knijnenburg, J.T., Ehrensperger, F., Hurrell, F., Pratsinis, S.E., Langhans, W., Ziammermann, M.B. (2010) Iron from nanocompounds containing iron and zinc is highly bioavailable in rats without tissue accumulation. *Nat Nanotechnol.* 5: 374-380.
- Huang, S.S., FUC, H.L., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Schulte, P.M., Brauner, C.J. (2008) Effect of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ion regulatory development of spring Chinook salmon parr (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture.* 274: 109-117.
- Huber, D.L. (2005) Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small.* 1: 482-501.
- Irianto, A., Austin, B. (2002) Probiotic in aquaculture. *J Fish Dis.* 25: 1-10.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Chaudhry, Q.A. (2010) Complementary definition of nanomaterial. *Nanotoday.* 3: 165-8.
- Lee, Y.H., Layman, D.K., Bell, R.B., Norton, H.W.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.



- (1981) Response of glutathione peroxidase and catalase to excess dietary iron in rats. *J Nutr.* 111: 2195-2202.
21. Merrifield, D., Bardley, G., Baker, R., Davies, S. (2009) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. *Aquacult Nutr.* 16: 496-503.
22. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M. (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 15: 443-452.
23. Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puanqlaewe, J., Aoki, T. (2007) Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Fish Shellfish Immunol.* 31: 372-382.
24. Prochorov, A.M., Pavlov, G.V., Godwin, A.C., Okpattah, K.A.V. (2011) Nanotechnology in agriculture and food production. *J Appl Environ Biol Sci.* 1: 414-419.
25. Rahmati Andani, H.R., Tukmechi, A., Meshkini, S., Ebrahimi, H. (1389) Enhancement of rainbow trout resistant against *Aeromonas hydrophyla* and *Yersinia ruckeri* with isolated Lactobacilli from common carp intestine. *Iran J Vet Med.* 7: 26-35.
26. Rahmati Andani, H.R., Tukmechi, A., Meshkini, S., Sheikhzadeh, N. (2012) Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Ichthyol.* 28: 728-734.
27. Rather, M.A., Sharma, R., Aklakur, M. (2011) Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. A Prospective Mini-Review. *Aquaculture.* 23: 12-25.
28. Roeder, M., Roeder, R.H. (1968) Effect of iron on the growth rate of fishes. *J Nutri.* 90: 86-90.
29. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. (1999) Probiotics: how should they be defined. *Trends Food Sci Technol.* 10: 107-110.
30. Serrano, P.H. (2005) Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. (1<sup>st</sup> ed.) FAO Fisheries Technical Paper.
31. Tukmechi, A., Rahmati Andani, H.R., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N. (2011) Dietary administration of  $\beta$ -mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 923-928.
32. Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (1999) Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl Environ Microbiol.* 65: 2527-2533.



## The effects of iron nanoparticles in combination with *Lactobacillus casei* on growth parameters and probiotic counts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine

Mohammadi, N.<sup>1</sup>, Tukmechi, A.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia-Iran

<sup>2</sup>Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia-Iran

(Received 30 October 2014, Accepted 17 January 2015)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Today the use of natural substances plays a major role in improving the growth and immunity of aquatic organisms. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to evaluate the effects of Iron nanoparticles with *Lactobacillus casei* as a probiotic on growth parameters and probiotic counts in rainbow trout intestine. **METHODS:** Seven hundred and twenty fish with  $12 \pm 0.49$  g initial weight were prepared and after acclimatized to the laboratory conditions divided randomly into six groups. First group was selected as control, other groups were fed with a commercial diet supplemented with 108 CFU/g *Lactobacillus casei* (group 2), 50  $\mu$ g/kg Iron nanoparticles (group 3), 100  $\mu$ g/kg Iron nanoparticles (group 4), 50  $\mu$ g/kg Iron nanoparticles with 108 CFU/g *Lactobacillus casei* (group 5) and 100  $\mu$ g/kg Iron nanoparticles with 108 CFU/g *Lactobacillus casei* (group 6), respectively. Biometry and intestine bacteriologic examination were carried out at days 0 and 60. **RESULTS:** Results showed that growth parameters (weight gain, body weight gain, specific growth rate, daily growth rate, and condition factor and food conversion rate) were significantly higher in group 5 compared with the other groups. Also, intestine bacterial counts increased by using Iron nanoparticles in combination with *Lactobacillus casei*. The fish that received 100  $\mu$ g/kg Iron nanoparticles and probiotic had significantly higher bacterial counts in their intestine compared with the other groups. **CONCLUSIONS:** Based on the obtained results we conclude that diet supplementation with Iron nanoparticles and *Lactobacillus casei* as a probiotic could significantly improve growth parameters in rainbow trout. However, these results would warrant further study on the clinical application of these agents.

**Key words:** growth parameters, iron nanoparticles, *Lactobacillus casei*, rainbow trout

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Composition of the basal diet (%) used throughout the experiment.

**Table 2.** Growth performance of rainbow trout fed with diet of Iron nanoparticles and *Lactobacillus casei* for a period of 60 days.

**Table 3.** Probiotic counts (CFU/g) in fish intestine content at different time points.



\*Corresponding author's email: a.tukmachi@urmia.ac.ir, Tel: 0441-3440295, Fax: 0441-3440295

J. Vet. Res. 70, 1:47-53, 2015