

بررسی اثر سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شیربت (*Barbus grypus*)

تکاور محمدیان^{۱*}، مجتبی علیشاهی^۱، محمد رضا تابنده^۲، زینب دوس علی^۳، عبدالحسین جانگران نژاد^۱

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳) اداره کل شیلات استان خوزستان، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۲۱ شهریور ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۳ آذر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: باکتری‌های اسید لاکتیک، متداول‌ترین نوع باکتری‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک در آبی‌پروری استفاده می‌شوند. **هدف:** در این مطالعه اثرات سطوح مختلف باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان شیربت ارزیابی شد. **روش کار:** تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی شیربت با وزن حدود ۴۰ گرم به چهار تیمار (در سه تکرار) به صورت تصادفی تقسیم گردیدند. تیمار A، B و C به ترتیب با جیره غذایی حاوی، 5×10^6 CFU g^{-1} ، 5×10^7 CFU g^{-1} ، 5×10^8 CFU g^{-1} به مدت ۶۰ روز غذایی شدند. گروه شاهد با جیره فاقد باکتری تغذیه گردید. پس از اتمام دوره، تیمارها به مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک غذایی گردیدند. شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰، ۷۵ مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** ضریب رشد ویژه، میزان رشد روزانه و میزان رشد نسبی، در غلظت B پس از ۳۰ روز از شروع آزمایش، بهبود قابل توجهی پیدا کردند که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (۰/۰۵). فعالیت آنزیم کیموترپسین در تیمار B پس از ۳۰ روز و همچنین فعالیت آنزیم تریپسین در تیمار C پس از ۳۰ و ۶۰ روز، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p < 0/05$). در بقیه مراحل نمونه‌گیری و سایر آنزیم‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($p < 0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان داد که میزان 5×10^7 کلنی در گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در هر گرم خوراک برای دوره ۳۰ روزه و میزان 5×10^8 کلنی در گرم آن برای دوره ۶۰ روزه پرورش بهترین غلظت محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، شیربت، عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، پروبیوتیک

مقدمه

به موازات افزایش آگاهی از ارزش غذایی و بهداشتی ماهی به خصوص نقش آن در کاهش کلسترول خون، انتظار می‌رود که در آینده تقاضا برای مصرف ماهی افزایش یابد. لذا با توجه به شرایط کنونی که مزارع پرورش ماهی، خصوصاً ماهیان گرمابی در حال افزایش می‌باشند، لزوم افزایش دانش و آگاهی در مورد فن‌آوری زیستی این نوع ماهیان الزامی به نظر می‌رسد. در سطح جهانی، این صنعت از نظر تنوع گونه‌ای و افزایش تراکم و پرورش در حال گسترش است و در حال حاضر هدف از آبی‌پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید برای بهینه‌سازی سودآوری می‌باشد (۹). استفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از دست‌آوردهای مثبت در این زمینه قلمداد کرد و اخیراً در آبی‌پروری نیز متداول گردیده است (۲۰). برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که پروبیوتیک‌ها اثر مفیدی روی مراحل هضم در حیوانات آبی‌داری دارند. علاوه بر این، بعضی از باکتری‌ها ممکن است در مراحل هضم دو کفه‌ای‌ها، میگو و ماهی با تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتازها، لیپازها و تولید فاکتورهای ضروری رشد شرکت نمایند. مشاهدات مشابهی برای فلور میکروبی میگوی چینی (*Penaeus chinensis*) گزارش شده است که آنزیم‌های کاملی برای هضم و سنتز

ترکیبات تولید می‌کنند (۴). Giri و همکاران در سال ۲۰۱۳، تأثیر دوزهای مختلف لاکتوباسیلوس پلانناروم را در ماهی جوان *Labeo rohita* را مورد بررسی قرار دادند. Shyne Anand و همکاران در سال ۲۰۱۳، تأثیر مکمل غذایی ریز جلبک پریفیتون بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه *P. monodon* را مورد مطالعه قرار دادند. Lara-Flores و همکاران در سال ۲۰۱۰، تأثیر پروبیوتیک‌های مخمری و باکتریایی را بر آنزیم‌های گوارشی تیلاپیا بررسی کردند.

ماهی شیربت یکی از مهم‌ترین ماهیان آب شیرین جنوب کشورمان می‌باشد که کیفیت گوشت و بازار پسنندی بالایی دارد و اخیراً امکان پرورش آن در حوضچه‌های خاکی در حال بررسی است (۱۵). بدیهی است که جهت پرورش ماهیان بومی ملزم به شناسایی عوامل بیماری‌زای آن‌ها نیز باشیم. نام علمی این ماهی *Barbus grypus* می‌باشد. در منابع نام‌های مترادف تورگرپیوس و لبوباربوس کوشچی برای آن ذکر شده است. نام محلی آن به فارسی شیربت و در زبان عربی شیوط می‌باشد که سابقه ۱۵۰۰ ساله دارد (۱۵). با توجه به کمبود اطلاعات در مورد استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در ماهیان بومی استان خوزستان و افزایش گرایش به استفاده از این باکتری در آبی‌پروری در کل جهان، بررسی اثر غلظت‌های



گوارش ماهیان، در روز صفر (اول شروع آزمایش)، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را با استفاده از روش آسان کشتی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبد گشایی آن‌ها صورت گیرد (۸). سپس بلافاصله در دمای 4°C - (تانک ازت مایع) نگهداری شدند (۱۶).

نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از تانک ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0.001g توزین گردید و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی - حجمی) محلول بافر هموژن بر روی نمونه ریخته شد. نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی هموژن شدند (۲۵، ۷).

سنجش آنزیم‌های گوارشی (تهیه عصاره آنزیمی): برای ساخت بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، کیموتریپسین، آلفا-آمیلاز و لیپاز)، 100 mM Tris-HCl ، 10 mM EDTA ، $0.1\% \text{ Triton X}$ ، 10 mM ، 0.1% در $\text{pH } 7.8$ ترکیب گردید. سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند، نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به داخل اپندورف‌ها ریخته شده و سپس داخل سانتریفوژ یخچال دار قرار داده شدند و در دمای 4°C سانتریفوژ گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (۲۵).

استخراج آنزیم روده‌ای: برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانتول 50 mM ، بافر 2 mM HCl-Tris در $\text{pH}=7$ به نسبت $1:30$ وزنی - حجمی استفاده گردید و به مدت ۱ دقیقه در 1000 rpm سانتریفوژ شد (۷). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، کلرید کلسیم 0.1 M به هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در 9000 دور سانتریفوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: فعالیت ۵ آنزیم گوارشی آلفا-آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز، فسفاتاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و در دسته پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، لذا محاسبات فعالیت آنزیمی بیشتر بر اساس پروتئین محلول انجام گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسین، از سوبسترای N -بنزوئیل- I -آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N -بنزوئیل- I -آرژنین تبدیل می‌شود. نتایج در طول موج 253 nm قرائت نوری صورت گرفت (۱۰). ابتدا $180\text{ }\mu\text{l}$ از محلول سوبسترای BAEE با $570\text{ }\mu\text{l}$ از اسید کلریدریک 1 mM مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمای 25°C قرار گرفتند. بعد نمونه به میزان $30\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه رقیق شده اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل UV 2802) در طول موج 253 nm انجام شد.

برای تعیین فعالیت آنزیم کیموتریپسین از بنزوئیل- I - تیروزین

مختلف آن بر فاکتورهای رشدی و آنزیم‌های دستگاه گوارش ماهی شیربت هدف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه ماهی: تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی شیربت پرورشی با وزن حدود 40 g از منطقه شوشتر خریداری و با مراعات شرایط استاندارد انتقال، به سالن آکواریوم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. ماهی‌ها به مدت دو هفته به منظور آداپتاسیون با شرایط سالن آکواریوم، با خوراک معمولی تغذیه شده و سپس برای انجام تحقیق تیمار بندی گردیدند. غذاهای با خوراک بیومار به میزان 3% وزن بدن و روزانه در ۳ نوبت به مدت ۶۰ روز و برای بررسی اثر پروبیوتیک بر آنزیم‌های گوارشی به مدت ۱۵ روز با غذای معمولی غذادهی انجام شد.

تیمار بندی ماهی‌ها: نحوه چیدن حوضچه‌ها، به صورت بلوک‌های تصادفی بود. تغذیه ماهیان بر اساس بیوماس و درجه حرارت آب بود. ماهی‌ها بصورت تصادفی به چهار گروه و هر گروه در سه تکرار تقسیم بندی گردیدند، بطوری که هر تکرار شامل ۳۰ قطعه بچه ماهی بود. تیمار اول با غلظت $5 \times 10^6\text{ CFU g}^{-1}$ ، تیمار دوم با غلظت $5 \times 10^7\text{ CFU g}^{-1}$ و تیمار سوم با دوز $5 \times 10^8\text{ CFU g}^{-1}$ لاکتوباسیلوس کازئی تغذیه شدند و تیمار چهارم با خوراک فاقد لاکتوباسیلوس کازئی تغذیه گردید.

نمونه‌گیری از ماهی‌ها: نمونه‌برداری از تیمارها به صورت کاملاً تصادفی و به تعداد ۳ عدد از هر تکرار (۹ قطعه از هر تیمار) بود. البته وزن و طول کل ماهی‌های هر تیمار در مراحل نمونه‌گیری تعیین گردید. زمان‌های نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ جهت بیومتری، محاسبه فاکتورهای رشد و سنجش میزان آنزیم در نظر گرفته شد.

فاکتورهای مورد بررسی: شاخص‌های رشد تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ بر اساس رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شدند (۲۶): ضریب رشد ویژه (SGR) = $100 \times (\text{دوره پرورش به روز} / W_1 - \ln W_2)$ / W_1 ضریب تبدیل غذایی (FCR) = میزان کل وزن تر کسب شده (g) / میزان غذای دریافت شده (g)

میزان کارایی پروتئین (PER) = میزان وزن تر کسب شده (g) / میزان کل پروتئین دریافت شده

فاکتور وضعیت (CF) = $100 \times [(\text{طول کل ماهی } L^3 \text{ cm}) / (\text{وزن ماهی } W \text{ g})]$

میزان رشد روزانه (DWG) = میانگین وزن نهایی - میانگین وزن اولیه (g) / تعداد روزهای آزمایش (d)

درصد میزان بقاء = $100 \times (\text{تعداد ماهیان اولیه} / \text{تعداد ماهیان زنده مانده})$
میزان رشد نسبی (RGR) = $100 \times (\text{وزن نهایی (g)} - \text{وزن اولیه (g)}) / \text{وزن اولیه (g)}$

انجام مراحل نمونه‌گیری از دستگاه گوارشی: نمونه‌گیری از دستگاه



رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی بین ۴ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه با ضریب اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی 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 ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر شاخص‌های رشد ماهی شیربت در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین میزان رشد نسبی بعد از ۳۰ روز مربوط به تیمار (B) بود که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). نتایج حاصل از محاسبه میزان رشد نسبی در روز ۶۰ نیز نشان داد که بیشترین میزان مربوط به تیمار (C) است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0/05$). بیشترین میزان رشد روزانه در روز ۳۰ آزمایش مربوط به تیمار پروبیوتیکی (B) و در روز ۶۰ مربوط به تیمار (C) و (B) بود. ضریب رشد ویژه تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار گرفت، به طوری که در روز ۳۰ آزمایش، تیمارهای پروبیوتیکی (B) بالاترین ضریب رشد ویژه را نشان داد که با تیمار شاهد و (A) اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$)، ولی میزان آن در روز ۶۰ نسبت به روز ۳۰ کاهش پیدا کرد. ضریب رشد ویژه در روز ۶۰، در تیمار (C) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در روز ۳۰ آزمایش، تیمار (B) و در روز ۶۰ تیمار (C) بهترین وضعیت در روز ۳۰ آزمایش، بالاترین میزان را در تیمار (C) داشته است. اما در روز ۶۰ بیشترین میزان در تیمار (B) مشاهده گردید. میزان کارایی پروتئین در روز ۳۰ در تیمار (A) و در روز ۶۰ تیمار (C) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$).

درصد میزان بقا: یافته‌های به دست آمده از این تحقیق، نشان داد که افزودن غلظت‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی به جیره غذایی ماهیان شیربت، تأثیری در افزایش درصد بازماندگی نداشته است. به طوری که در طول دوره پرورش هیچ گونه تلفاتی نه تنها از ماهیان تغذیه شده با دوزهای مختلف پروبیوتیکی مشاهده نشد، بلکه تیمار شاهد نیز هیچ گونه تلفاتی را نشان نداد. در نتیجه با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق در انتهای دوره آزمایش، از نظر آماری، بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$).

فعالیت آنزیم‌های گوارشی: نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شیربت، بعد از تجویز خوراکی پروبیوتیک در طول دوره مطالعه در جدول ۲ بیان شده است. نتایج حاصل نشان داد که در روز ۶۰، تیمار (A) نسبت به تیمار کنترل بالاترین میزان آمیلاز را داشته، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). در روز ۷۵، بعد از قطع

اتیل استر (BTEE) به عنوان سوبسترا استفاده گردید (۱۴). ابتدا ۱/۴ ml از محلول سوبسترا را به ۱/۵ ml بافر تریس در لوله آزمایش اضافه کرده، سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۴ الی ۵ دقیقه برای هم دمایی در دمای ۲۵°C قرار گرفتند. میزان ۱۰۰ µl عصاره آنزیمی در دمای ۲۵°C به آن اضافه گردید و افزایش جذب در ۲۵۶nm هر دقیقه تا ۵ دقیقه سنجیده شد (۱۰).

برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد (۳۹، ۵). ابتدا ۲۵۰ µl از عصاره آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایشی و ۲۵۰ µl آب مقطر نیز به لوله دیگری به عنوان شاهد وارد شد. سپس عمل آنکوباسیون به مدت ۳-۴ دقیقه در ۲۵°C انجام شد تا به دمای تعادل برسند. سپس ۲۵۰ µl از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل آنکوباسیون دقیقاً به مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰ µl معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها از حمام خارج شده و در دمای اتاق خنک شدند. سپس ۲/۵ ml آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ nm انجام گرفت. سپس قرائت نوری انجام شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) بدست آمد. واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (۳۹، ۵).

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington در سال ۱۹۹۱ استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به عنوان سوبسترا استفاده گردید. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر ۰/۸ Tris-HCl M، محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ mM و معرف تیمول فتالین ۰/۹٪ استفاده شد. جهت سنجش این آنزیم از کیت آلکالین فسفاتاز (۱۰-۵۰۳ Zist Ref: Chem) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بیکربنات را با یک قسمت محلول معرف ۰/۱ Para-nitrophenylphosphate M مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد تا هم دمایی صورت گیرد. میزان ۰/۵ ml از این مخلوط را با ۲۰ µl محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار می‌دهیم تا انکوبه شود. پس از این زمان ۵ ml محلول ۱ g/l سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ۴۰۵ nm اندازه‌گیری شد.

شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله آزمایش اضافه شد.

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز اطلاعات از نرم افزار آماری SPSS و پیرایش ۱۶ استفاده شد و تأثیر پروبیوتیک بر عملکرد



جدول ۱. مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری (نتایج براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده‌اند). تیمار A: ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی 5×10^6 CFU g لاکتوباسیلوس کازئی. تیمار B: تیمار تغذیه شده با میزان 5×10^7 CFU باکتری لاکتوباسیلوس کازئی. تیمار C: تیمار تغذیه شده با میزان 10^4 CFU $5 \times$ باکتری لاکتوباسیلوس کازئی. *حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون، و حروف بزرگ لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد).

شاخص	تیمار	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
میزان رشد نسبی	تیمار A	۴/۳۷ \pm ۰/۴۹ ^{aA}	۱۰/۹۶ \pm ۰/۴۷ ^{aB}	۱۹/۹۱ \pm ۰/۶۲ ^{aC}
	تیمار B	۳۴/۲۹ \pm ۳/۱۷ ^{aA}	۴۵/۵۸ \pm ۶/۰۹ ^{aAB}	۵۷/۳ \pm ۷/۰۵ ^{aB}
	تیمار C	۲۳/۱۱ \pm ۱/۰۹ ^{aA}	۶۲/۰۰ \pm ۰/۸۶ ^{aB}	۷۲/۱ \pm ۱/۰۹ ^{aC}
میزان رشد روزانه	کنترل	۱۷/۰۵ \pm ۶/۰۳ ^{aA}	۲۷/۴۳ \pm ۴/۰۵ ^{aB}	۲۸/۰۲ \pm ۰/۸۲ ^{aB}
	تیمار A	۰/۰۶ \pm ۰/۰۷ ^{aA}	۰/۰۸ \pm ۰/۰۳ ^{aB}	۰/۱۱ \pm ۰/۰۳ ^{aC}
	تیمار B	۰/۵۴ \pm ۰/۰۴ ^{aB}	۰/۳۵ \pm ۰/۰۳ ^{aA}	۰/۳۲ \pm ۰/۰۳ ^{aA}
ضریب رشد ویژه	تیمار C	۰/۲۴ \pm ۰/۰۱ ^{aA}	۰/۳۲ \pm ۰/۰۰۲ ^{aC}	۰/۳ \pm ۰/۰۰۲ ^{aB}
	کنترل	۰/۲۶ \pm ۰/۰۸ ^{aA}	۰/۲۱ \pm ۰/۰۲ ^{aA}	۰/۱۷ \pm ۰/۰۲ ^{aA}
	تیمار A	۰/۰۶ \pm ۰/۰۰۶ ^{aA}	۰/۰۷ \pm ۰/۰۰۳ ^{aB}	۰/۱۰ \pm ۰/۰۰۳ ^{aC}
ضریب تبدیل غذایی	تیمار B	۰/۴۲ \pm ۰/۰۳ ^{aB}	۰/۲۷ \pm ۰/۰۳ ^{aA}	۰/۲۳ \pm ۰/۰۲ ^{aA}
	تیمار C	۰/۳ \pm ۰/۰۱ ^{aA}	۰/۳۴ \pm ۰/۰۰۳ ^{aB}	۰/۳۱ \pm ۰/۰۰۳ ^{aA}
	کنترل	۰/۲۲ \pm ۰/۰۷ ^{aA}	۰/۱۷۵ \pm ۰/۰۲ ^{aA}	۰/۱۴ \pm ۰/۰۰۳ ^{aA}
ضریب تبدیل غذایی	تیمار A	۵/۳۹ \pm ۰/۶۵ ^{aB}	۲/۹۶ \pm ۰/۱۲ ^{aA}	۲/۲ \pm ۰/۰۶ ^{aA}
	تیمار B	۰/۸ \pm ۰/۰۶ ^{aA}	۱/۲۲ \pm ۰/۱۳ ^{aB}	۲/۲ \pm ۰/۲۴ ^{aC}
	تیمار C	۱/۰۹ \pm ۰/۰۴ ^{aC}	۰/۶۷ \pm ۰/۰۰۵ ^{aA}	۰/۸۷ \pm ۰/۰۰۸ ^{aB}
فاکتور وضعیت	کنترل	۱/۰۹ \pm ۰/۳۹ ^{aA}	۱/۳۹ \pm ۰/۱۷ ^{aA}	۳/۱۶ \pm ۰/۰۳ ^{aB}
	تیمار A	۰/۳۹ \pm ۰/۰۷ ^{aB}	۰/۲۴ \pm ۰/۱۰ ^{aAB}	۰/۰۸ \pm ۰/۰۵ ^{aA}
	تیمار B	۳۴/۲۹ \pm ۰/۰۱ ^{aA}	۰/۴۱ \pm ۰/۰۵ ^{aB}	۰/۲۳ \pm ۰/۰۴ ^{aA}
میزان کارایی پروتئین	تیمار C	۰/۷۴ \pm ۰/۰۷ ^{aC}	۰/۳۶ \pm ۰/۰۵ ^{aB}	۰/۰۸ \pm ۰/۰۵ ^{aA}
	کنترل	۰/۵۱ \pm ۰/۰۸ ^{aA}	۰/۳۷ \pm ۰/۰۶ ^{aBA}	۰/۳۵ \pm ۰/۰۳ ^{aA}
	تیمار A	۰/۳۸ \pm ۰/۰۴ ^{aA}	۰/۷ \pm ۰/۰۲ ^{aB}	۰/۹۴ \pm ۰/۰۲ ^{aC}
میزان کارایی پروتئین	تیمار B	۲/۵ \pm ۰/۱۲ ^{aC}	۱/۷ \pm ۰/۱۷ ^{aB}	۰/۹۵ \pm ۰/۱۰ ^{aA}
	تیمار C	۱/۹۱ \pm ۰/۰۷ ^{aA}	۳/۰۶ \pm ۰/۰۲ ^{aC}	۲/۳۷ \pm ۰/۰۲ ^{aB}
	کنترل	۲/۰۷ \pm ۰/۶۹ ^{aB}	۱/۵ \pm ۰/۱۸ ^{aB}	۰/۶۵ \pm ۰/۰۷ ^{aA}

روز ۷۵ پس از قطع غذاهای پروبیوتیکی میزان تریپسین در تمام تیمارها افزایش یافته و بیشترین میزان مربوط به تیمار A بود.

نتایج حاصل در روز ۶۰ نشان داد که تیمار C بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را دارد. روز ۷۵ پس از قطع غذاهای پروبیوتیکی میزان آلکالین فسفاتاز در تمام تیمارها افزایش یافته و بیشترین میزان مربوط به تیمار A می‌باشد.

بحث

پروبیوتیک‌ها به عنوان باکتری‌های زنده یا محصولات کشت شده تعریف می‌شوند که با تولید مواد جلوگیری کننده، رقابت برای جذب مواد شیمیایی و چسبندگی در دستگاه گوارشی باعث اثرات سودمندی برای میزبان می‌شوند. از دیگر خواص پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود عملکرد سیستم ایمنی و ایجاد تعادل میکروبی در دستگاه گوارش اشاره کرد (۲۱، ۳۵).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سطوح مختلف از پروبیوتیک

غذاهای با جیره پروبیوتیکی، میزان آمیلاز در تیمارهای آزمایشی نسبت به روز ۶۰ افزایش یافت.

میزان لیپاز در روز ۳۰ آزمایش، در تیمار (C) بالاترین و بیشترین میزان را داشت، اما اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج روز ۶۰ نیز نشان‌دهنده کاهش میزان فعالیت لیپاز در تیمارها بود. در روز ۷۵ پس از قطع غذاهای، هیچ تغییری بین تیمارهای B و C مشاهده نشد، اما میزان لیپاز در روز ۷۵ در تیمار A افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p < 0/05$).

در روز ۳۰ آزمایش، تیمار B، بیشترین میزان کیموترپسین را داشته که این میزان با سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در روز ۷۵، پس از قطع غذاهای پروبیوتیکی، میزان کیموترپسین در تمام تیمارها کاهش یافت.

بیشترین میزان تریپسین در روز ۳۰، مربوط به تیمار C بود که با سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). نتایج حاصل در روز ۶۰ نیز نشان داد که تیمار C، بیشترین میزان فعالیت تریپسین را دارد.



جدول ۲. مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری (نتایج براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند). *حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، در هر ستون، و حروف بزرگ لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، در هر ردیف می‌باشد.

شاخص	تیمار	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
آلفا-آمیلاز	تیمار A	۰/۸۴±/۰۴۲ ^{abAB}	۰/۸۰±/۰۲۱ ^{abAB}	۰/۵۱±/۰۲۱ ^{baA}	۰/۷۲±/۰۶۱ ^{bbB}
	تیمار B	۰/۶۱±/۰۲۰ ^{aB}	۰/۶۱±/۰۱۸ ^{aB}	۰/۲۱±/۰۰۴ ^{aA}	۰/۵۶±/۰۱۳ ^{aB}
	تیمار C	۰/۴۱±/۰۱۴ ^{aB}	۰/۶۳±/۰۰۸ ^{aC}	۰/۲۰±/۰۰۸ ^{aA}	۰/۶۵±/۰۱۸ ^{aC}
لیپاز	کنترل	۰/۵۴±/۰۱۹ ^{aA}	۰/۸۹±/۰۲۵ ^{bbB}	۰/۳۱±/۰۰۴ ^{aA}	۰/۵۱±/۰۱۸ ^{aA}
	تیمار A	۰/۱۰±/۰/۵۱ ^{aA}	۰/۵۹±/۰/۳۴ ^{aA}	۰/۲۲±/۰/۴۱ ^{aA}	۰/۷۲±/۰/۵۰ ^{bbB}
	تیمار B	۰/۲۳±/۰/۵۵ ^{abA}	۰/۴۵±/۰/۸۳ ^{abA}	۰/۵۷±/۰/۲۶ ^{aA}	۰/۵۶±/۰/۴۷ ^{aA}
کیموتریپسین	تیمار C	۰/۲۸±/۰/۶۷ ^{abA}	۰/۷۸±/۰/۷۳ ^{bbB}	۰/۳۵±/۰/۲۷ ^{aA}	۰/۶۵±/۰/۳۳ ^{aA}
	کنترل	۰/۷۹±/۰/۲۲ ^{baA}	۰/۷۶±/۰/۴۶ ^{abA}	۰/۲۱±/۰/۴۵ ^{abAB}	۰/۵۱±/۰/۲۴ ^{aA}
	تیمار A	۰/۱۱±/۰/۰۵ ^{aB}	۰/۱۲±/۰/۰۳ ^{aB}	۰/۰۵±/۰/۰۲ ^{aA}	۰/۱۸±/۰/۰۶ ^{bcC}
تریپسین	تیمار B	۰/۱۸±/۰/۰۷ ^{aA}	۰/۲۶±/۰/۰۶ ^{baA}	۰/۰۵±/۰/۱۱ ^{bbB}	۰/۱۸±/۰/۰۶ ^{baA}
	تیمار C	۰/۱۳±/۰/۰۳ ^{aB}	۰/۱۳±/۰/۰۳ ^{aB}	۰/۰۶±/۰/۰۲ ^{aA}	۰/۰۷±/۰/۰۱ ^{aA}
	کنترل	۰/۱۹±/۰/۰۳ ^{aAB}	۰/۱۵±/۰/۰۳ ^{aA}	۰/۳۵±/۰/۲۸ ^{bbB}	۰/۲۳±/۰/۰۶ ^{baB}
آلکالین فسفاتاز	تیمار A	۰/۷۸±/۰/۹۹ ^{aA}	۰/۵۸±/۰/۷۶ ^{bc}	۰/۳۹±/۰/۳۲ ^{aA}	۰/۸۸±۰/۲۲ ^{bbB}
	تیمار B	۰/۷۲±/۰/۶۳ ^{abAB}	۰/۵۱±/۰/۷۴ ^{abAB}	۰/۷۲±/۰/۲۰ ^{aA}	۰/۸۸±۰/۲۲ ^{bbB}
	تیمار C	۰/۷۴±/۰/۶۲ ^{aA}	۰/۲۰±/۰/۵۴ ^{caB}	۰/۳۷±/۰/۸۱ ^{bbB}	۰/۷۲±/۰/۲۶ ^{aC}
آلکالین فسفاتاز	کنترل	۰/۶۵±/۰/۲۳ ^{aAB}	۰/۱۰±/۰/۶۹ ^{aA}	۰/۴۳±/۰/۶۳ ^{bbC}	۰/۳±/۰/۹۴ ^{aC}
	تیمار A	۰/۲۸۹±/۰/۳۲۴/۰/۲۵ ^{abB}	۰/۲۵±/۰/۲۱/۰/۵۹ ^{aA}	۰/۳۶±/۰/۷/۰/۲۵ ^{aA}	۰/۲۷۷/۰/۷۲±۰/۱۳۷/۰/۹۵ ^{cbB}
	تیمار B	۰/۲۱۷±/۰/۸۳۳۹/۰/۰۷ ^{aB}	۰/۳±/۰/۱۸/۰/۶۱ ^{aA}	۰/۲۷/۰/۷۸±۰/۷۹ ^{aA}	۰/۵۹/۰/۹±۰/۴۴ ^{aA}
کنترل	تیمار C	۰/۲۳۲/۰/۴۹±۰/۱۴۷/۰/۱۳ ^{aB}	۰/۵۴±/۰/۱۷/۰/۸۸ ^{aA}	۰/۱۳۶/۰/۱۵۶±۰/۴۵/۰/۳۹ ^{baB}	۰/۶۲/۰/۲۴±۰/۱۴/۰/۵۴ ^{aA}
	کنترل	۰/۲۳۸/۰/۹۸±۰/۱۲۶/۰/۸۷ ^{aB}	۰/۵±/۰/۱۶/۰/۵۰ ^{aA}	۰/۱۴/۰/۵۵±۰/۸۳/۰/۳۶ ^{baB}	۰/۱۷۲/۰/۷۳±۰/۵۳/۰/۷۴ ^{baB}

و همکاران در سال ۲۰۰۰، Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز مشابه می‌باشد (۲۲، ۱۲).

افزایش شاخص‌های رشد به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها در تحقیقات مختلف مد نظر بوده و گزارش‌های متعددی از تأثیر بهبود رشد به دنبال تجویز پروبیوتیک‌ها وجود دارد که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. Shyne Anand و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند که تغذیه با لاکتوباسیلوس کازئی و پلانتاروم به میزان 10^7 CFU g^{-1} به مدت ۳۰ روز دارای بهترین عملکرد رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود (۲۷). طبق تحقیقات Notash و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از پروبیوتیک تجاری پروتکسین (ترکیبی از مخمر و باکتری‌های پروبیوتیکی شامل: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، اسیدوفیلوس، بولگاریس، دلبروکتی، رامنسوس)، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های ۱٪، ۲٪ و ۳٪ در خوراک، بهترین غلظت را برای بهبود رشد، ۳٪ گزارش نمودند. نتایج تحقیق فوق با گروه C در روز ۳۰ و گروه B در روز ۶۰ مشابه بوده است (۲۳). هم‌چنین Hosseinifar و همکاران در سال ۱۳۸۹، با تجویز ۳ سطح ۱، ۲ و ۳٪ پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* var در بچه فیل ماهی (*Huso huso*) بهبود شاخص‌های رشد را گزارش نمودند (۱۳). Lara-Flores و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز در ماهی تیلاپیا با استفاده از مخمر *S. cerevisiae* var نتایج مشابهی را گزارش نمودند (۱۸). Ramos

لاکتوباسیلوس کازئی مورد استفاده با غلظت B تا روز ۳۰ دوره پرورشی و غلظت C تا روز ۶۰ دوره پرورشی باعث بهبود عملکرد رشد و تغذیه ماهی شیربت شد، به طوری که ضریب تبدیل غذایی FCR، SGR، RGR، PER و DWG به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بهبود یافت ($p < 0.05$). این بهبود رشد می‌تواند به علت تأثیر مثبت این باکتری بر فلور دستگاه گوارش و افزایش میزان هضم و جذب غذای مصرفی صورت گرفته باشد. تحقیقات متعددی در این زمینه صورت گرفته که بیانگر این مسئله هستند که افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی انواع ماهیان، رشد آن‌ها را افزایش می‌دهد که این منطبق با نتیجه تحقیق جاری می‌باشد.

در مطالعه‌ای، Giri و همکاران در سال ۲۰۱۳، لاکتوباسیلوس پلانتاروم را در ۳ غلظت به جیره‌ی غذایی ماهی *Labeo rohita* اضافه کردند. در مطالعه‌ی مذکور، FCR و WG در مدت ۶۰ روز افزایش معنی‌داری را نشان دادند، به طوری که در غلظت 10^8 ، 10^{10} ، SGR به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (۱۱). هم‌چنین نتایج مشابهی توسط Venkat و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر می‌گویی روزنبرگی، Aly و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر تیلاپیا نیل، Al-Dohail و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر گربه ماهی گاپرینوس، Sun و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر ماهی هامور معمولی، Suzer و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر ماهی شانک سر طلایی به دست آمد (۲، ۳، ۳۱، ۳۳، ۳۵). این نتایج با نتایج حاصله از تحقیقات Gomez-Gil



کارایی دستگاه گوارش را افزایش و در نهایت موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شوند. نتایج تحقیقاتی که در آن‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده شده، نشان داده که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند (۳۸).

لذا احتمالاً غلظت‌های مختلف باکتری‌های پروبیوتیکی آزمایشی (تیمار B و C) به این وسیله توانسته‌اند سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره غذایی بچه ماهیان شیرت شوند و به خصوص فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین و پس از آن تریپسین که از پروتئازها هستند را افزایش دهند. موارد مشابهی از توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش میگوی چینی *P. chinensis* (۳۷)، ماهی کلمه *Rutilus rutilus* (۳۷)، شانگ (۳۲)، هامور (۳۰)، میگوی سفید هندی (۴۰)، میگوی پاسفید غربی (۳۶) گزارش شده است که همگی تأیید کننده‌ی نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم‌های گوارشی کیموتریپسین و تریپسین در روز ۳۰ آزمایش در غلظت B و C در شیرت می‌باشد که می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات ناشناخته تحریک کننده‌ی رشد و تحریک کننده‌ی تولید آنزیم‌های گوارشی در جیره‌های حاوی پروبیوتیک باشد که باعث افزایش تولید آنزیم‌های گوارشی توسط ماهی می‌شود (۴۰، ۳۷، ۳۶، ۳۲، ۳۰، ۲۸). هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در ماهیان سفید تغذیه شده با پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید (۲۹) نتایج آزمایش حاضر را که در آن نیز از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی استفاده شده است، تأیید می‌کند.

می‌توان نتیجه گرفت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در غلظت‌های B و C توانایی بیشتری در تولید آنزیم‌های خارج سلولی پروتئاز در هضم و جذب بیشتر پروتئین‌ها و یا تحریک بیشتر دستگاه گوارش شیرت با ترشح بیشتر پروتئازها داشته است. احتمالاً عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم لیپاز و آلفا-آمیلاز بین تیمار آزمایشی و تیمار شاهد به دلیل ترکیب شیمیایی غذا و کم بودن میزان چربی و کربوهیدرات‌های مصرفی و تحریک کمتر دستگاه گوارش به تولید آنزیم لیپاز و آلفا-آمیلاز نسبت به آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین باشد. دلیل دیگر می‌تواند عدم توانایی تولید لیپاز و آلفا-آمیلاز به صورت خارج سلولی توسط باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش و یا عدم تحریک سیستم دستگاه گوارش به تولید این آنزیم‌ها به شکل مؤثری باشد.

در مطالعه Tovar و همکاران در سال ۲۰۰۲، افزودن پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces cerevisiae* به جیره غذایی ماهی سی باس، نه تنها تأثیری بر فعالیت آنزیمی این ماهی نداشت، بلکه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز را نیز کاهش داد (۳۳). هم‌چنین نتایج مشابهی از تحقیقات دیگر محققین در ارتباط با اثر تجویز پروبیوتیک‌ها بر آنزیم‌های گوارشی ماهی منتشر شده است، به عنوان مثال استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی تجاری از خانواده باسیلوس‌ها در پرورش میگوی سفید هندی

و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۲ پروبیوتیک تجاری را به صورت جداگانه در فزل آلامی رنگین کمان بررسی کردند، پس از ۲۸ روز از شروع آزمایش، تأثیر معنی‌داری در عملکرد رشد و نرخ رشد مشاهده نگردید. اما پس از اتمام دوره‌ی تحقیق (روز ۵۶) اختلاف معنی‌داری در تیمار پروبیوتیکی تجاری A۱ (حاوی انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس، باسیلوس و پدیوکوکوس) نسبت به گروه کنترل در شاخص افزایش وزن و SGR به دست آمد که با تحقیق ما مطابقت دارد (۲۴).

Soleimani و همکاران در سال ۲۰۱۲، بر بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی و عملکرد رشد ماهی کلمه خزر در مرحله‌ی بچه ماهی نارس که از مکمل غذایی فروکتوالیگوساکارید که نوعی پروبیوتیک است در ۳ سطح ۱٪، ۲٪ و ۳٪، به مدت ۷ هفته انجام شد، بالاترین درصد بقا مربوط به تیمار ۳٪ و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و عملکرد رشد بالا (SGR, FCR) مربوط به تیمار ۲٪ و ۳٪ بودند (۲۹).

نتایج حاصل از تأثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC ۱۶۰۸) در ماهی شیرت بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین، آلکالین فسفاتاز و لیپاز، نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های فوق بود، به طوری که کیموتریپسین در تیمار B در روز ۳۰ و تریپسین در روز ۳۰ و ۶۰ در تیمار C نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). اما فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای آزمایشی در اواسط و انتهای دوره پرورش اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($p > 0.05$).

مواد مغذی درشت مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های جیره در فعالیت آنزیم‌های گوارشی شیرت مؤثر هستند. در این تحقیق فرمولاسیون جیره‌هایی با مواد مغذی و انرژی یکسان برای مقایسه مکمل‌های پروتئینی و گروه کنترل استفاده گردید. Shyne Anand و همکاران در سال ۲۰۱۳، فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در میگوی *P. monodon* تحت تأثیر مکمل غذایی پریفیتون مورد بررسی قرار دادند. در بیشترین غلظت مکمل غذایی پریفیتون، تأثیر معنی‌داری در آنزیم‌های گوارشی آن مشاهده نگردید، فعالیت بالای از لیپاز، تریپسین و کیموتریپسین در سطوح پائین‌تر مکمل غذایی پریفیتون به دست آمد (۲۷). همچنین Wang و همکاران در سال ۲۰۰۷ مکمل پروبیوتیکی را بر میگوی *P. vannami* نیز مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها حاکی از عدم تأثیر گذاری مکمل غذایی بر آنزیم‌های گوارشی است (۳۷).

تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، بهبود تعادل میکروبی روده و در نتیجه بهبود هضم و جذب مواد غذایی و مصرف غذا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۲). همین‌طور تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بررسی‌های محققین مختلف بر روی آبزیان دیده شده است (۲۹). بنابراین باکتری‌های ذکر شده با شرکت در فرآیند هضم،



References

1. Abd El-Rhman, A.M., Khatlab, Y.A., Shalaby, A.M. (2009) *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 27: 175-180.
2. Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M. (2009) Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquac Res.* 40: 1642-1652.
3. Aly, S.M., Ahmed, Y., Ghareeb, A., Mohamed, M.F. (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 128-136.
4. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vandrell, D., Muzquiz J.L. (2006) Review: The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* 114: 173-186.
5. Bernfeld, P. (1955) Amylases α and β . In: *Methods in Enzymology*. Colowick, P., Kaplan, N.O. (eds.). (1st ed.) Academic press, New York, USA. p. 149-157.
6. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
7. Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. (1999) Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture.* 171: 109-111.
8. Chang, A.S.C., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A.B. (2002) Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish, *Symphysodon aequifasciata*. *Aquaculture.* 203: 321-333.
9. Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. (2009) Microbial ecology of the gastrointes-

Fenneropenaeus indicus تأثیری بر فعالیت آنزیم لیپاز نداشته و تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان نداد (۴۰). ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب جهت مقایسه ضریب رشد ماهی، پذیرش غذا و همچنین ظرفیت گوارشی، مورد استفاده واقع شود. با توجه به تولید آنزیم‌های گوارشی توسط دستگاه گوارش بچه ماهیان شیربت و تحریک و تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شده در این آزمایش، نمی‌توان سهم فعالیت آنزیمی ناشی از فعالیت باکتری‌ها و تولید آنزیم توسط بچه ماهیان را تفکیک نمود (۳۲). بهبود شاخص‌های رشدی در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی احتمالاً به بهبود فعالیت‌های گوارشی به وسیله سنتز ویتامین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌ها مرتبط می‌باشد که منجر به بهبود هضم‌پذیری و افزایش وزن شده است. همچنین کاهش ضریب تبدیل غذایی در مطالعه حاضر بیانگر بهبود کارایی استفاده از مواد غذایی در زمانی است که لاکتوباسیلوس کازئی در دوره‌های ۳۰ و ۶۰ روزه به ترتیب در غلظت‌های 5×10^7 CFU g^{-1} و 5×10^8 CFU g^{-1} استفاده شده است.

در دوره ۳۰ روزه غلظت B، بهترین عملکرد رشد را داشته است، چرا که تأثیرات معنی‌داری بر روی آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند کیموترپسین داشته است و در دوره ۶۰ روزه غلظت C بهترین عملکرد رشد را داشته و آن را می‌توان به عملکرد بهتر آنزیم‌های گوارشی مربوط دانست.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشگاه شهیدچمران و دانشکده دامپزشکی ابراز می‌دارند.

- tinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res.* 1: 1-29.
10. Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95: 271-278.
 11. Giri, S.S., Sukumaran, V., Oviya, M. (2013) Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 660-666.
 12. Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. (2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture.* 191: 259-270.



13. Hosseinifar, S.H., Mirvaghefi, A.R., Majazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H.A., PourAmirani, M., Darvish Bastami, K. (2010) The probiotic effects of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on growth factors, survival, body composition and intestinal microbiota of Beluga juvenile (*Huso huso*). Iran Sci Fish J. 9: 55-66.
14. Hummel, B.C. (1959) A modified spectrophotometric determinations of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Can J Biochem Physiol. 37: 1393-1399.
15. Kahkesh, F.B., Yooneszadeh Feshalami, M., Amiri, A., Nickpey, M. (2010) Effect of ovaprim, ovatid, HCG, LHRH-a2, LHRH-a2 + CPE and carp Pituitary in Benny (*Barbus sharpeyi*) artificial breeding. Glob Vet. 5: 209-214.
16. Kuz'mina, V., Shekovtsova, N., Bolobonina, V. (2010) Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biol Bull. 37: 605-611.
17. Lara-Flores, M., Olivera-Novoa, M., Guzmán-Méndez, B., López-Madrid, W. (2003) Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216: 193-201.
18. Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L., Olivera-Novoa, M.A. (2010) Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*) and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Int J Fish Aquac. 2: 93-101.
19. Lily, D.M., Stillwell, R.H. (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 747-748.
20. Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J., Vadstein, O. (2001) Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. Aquac Int. 9: 225- 235.
21. McCracken, V.J, Gaskins, H.R. (1999) Probiotics and the immune systems. In: Probiotics: A Critical Review. Tannock, G.W. (ed.). (1st ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, England. p. 85-112.
22. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., 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. Notash, Sh., Naeemi Kararoodi, M., Shahabzadeh, S.H., Fadaeifard, F. (2009) Study on the effect of different amount of probiotic protexin on weight gain, survival rate and FCR of rainbow trout. J Food Microbiol. 2: 33-40.
24. Ramos, M.A., Weber, B, Gonçalves, J.F, Santos, G.A., Rema, P., Ozório. R. (2013) Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol., Part A Mol Integr Physiol. 166: 302-307.
25. Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygrd, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U., Venturini, G. (2002) In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. J Sci Food Agric. 82: 644-654.
26. Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D.V., Planas, J., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M. (2010) Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Potential effects on the immune response. Fish Shellfish Immunol. 28: 296-302.
27. Shyne Anand, P.S., Kohli, M.P.S., Dam, R., Sundaray, J.K., Kumar, S., Sinha, A., Pailan, G.H., Sukham, M.K. (2013) Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. Aquaculture. 392-395: 59-68.
28. Skrodenytė-Arbačiauskienė, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., Skrupskelis, K. (2008) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. Fish Sci. 74: 1307-1314.
29. Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield,



- D.L., Barati, M., Abadi, Z.H. (2012) 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 Immunol.* 32: 316-321.
30. Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Lin, W.Y. (2011) Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 803-809.
31. Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Song, K., Li, J.S. (2011) Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquac Nutr.* 18: 281-289.
32. Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, S., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., Küçüksarı, H. (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture.* 280: 140-145.
33. Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., Lésel, R. (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture.* 204: 113-123.
34. Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K. (2004) Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res.* 35: 501-507.
35. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 655-671.
36. Wang, Y.B. (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 269: 259-264.
37. Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., Li, W.F. (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture.* 277: 203-207.
38. Wang, Y.B., Xu, Z. (2006) Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim Feed Sci Technol.* 127: 283-292.
39. Worthington, C.C. (1991) *Worthington Enzyme Manual Related Biochemical.* (3rd ed.) Freehold, New Jersey, USA.
40. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M. (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian Fenneropenaeus *indicus*. *Aquaculture.* 252: 516-524.



Effect of different levels of *Lactobacillus casei* on growth performance and digestive enzymes activity of Shirbot (*Barbus gryprus*)

Mohammadian, T.^{1*}, Alishahi, M.¹, Tabande, M.R.², Doos Ali, Z.³, Jangaran Nejad, A.¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³Khouzestan Fisheries Organization, Ahvaz, Iran

(Received 11 September 2016, Accepted 23 November 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Lactic acid bacteria are the most common class of bacteria used in aquaculture as probiotic. **OBJECTIVES:** In this study the effects of various levels of *Lactobacillus casei* on the growth performance and digestive enzymes activity of juvenile Shirbot were evaluated. **METHODS:** Four hundred-eighty juvenile Shirbot weighing 40 g were divided randomly in four treatments (in triplicate). Treatments of A, B and C were fed with 5×10^6 CFU g⁻¹, 5×10^7 CFU g⁻¹, 5×10^8 CFU g⁻¹, respectively for 60 days. Control group was fed with free-probiotic diet. After the period, treatments were fed with free-probiotic diet for 15 days. Growth indices and digestive enzymes were examined on days 0, 30, 60 and 75. **RESULTS:** In the Treatment B, Specific Growth Ratio, Daily Weight Growth and Relative Growth Rate, after 30 days from the beginning of experiment improved considerably which, compared to control group had significant difference ($p < 0.05$). Activity of chymotrypsin enzyme in treatment of group B after 30 days and similarly, trypsin in treatment of group C after 30 and 60 days, were increased significantly compared to control group ($p < 0.05$). In the other points of sampling and enzymes, considerable difference was not seen ($p > 0.05$). **CONCLUSIONS:** Results showed that 5×10^7 CFUg⁻¹ of *Lactobacillus casei* for 30 days and 5×10^8 CFUg⁻¹ for 60 days, are the best doses of probiotic.

Keyword: *Lactobacillus casei*, shirbot, growth performance, digestive enzymes activity, probiotic

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Comparison growth factors between trial treatments in different steps of sampling period. fed with diet containing 5×10^6 cfu g⁻¹ of *Lactobacillus casei* (group A), 5×10^7 *Lactobacillus casei* (group B), 5×10^8 *Lactobacillus casei* (group C) and control diet (without probiotic). Values are presented as mean \pm SD (n = 9). Values with a different small word superscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$) and values with a different capital word superscript in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Comparison digestive enzyme activity between trial treatments in different steps of sampling period. fed with diet containing 5×10^6 cfu g⁻¹ of *Lactobacillus casei* (group A), 5×10^7 *Lactobacillus casei* (group B), 5×10^8 *Lactobacillus casei* (group C) and control diet (without probiotic). Values are presented as mean \pm SD (n = 9). Values with a different small word superscript in the same column are significantly different ($p < 0.05$) and values with a different capital word superscript in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

*Corresponding author's email: T.mohammadian@scu.ac.ir, Tel: 061-33330073, Fax: 061-33360807

