مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۱، ۵۲- ۴۳
Journal of Veterinary Research. 72,1:43-52, 2017
Original Article

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

تکاور محمدیان[1*] مجتبی علیشاهی[1] محمد رضا تابنده[2] زینب دوس علی[3] عبدالحسین جانگران نژاد[1]

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 آبزی‌پروری 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، ۵×۱۰^{۶} CFU $g^{-۱}$ ، ۵×۱۰^{۷} CFU $g^{-۱}$، ۵×۱۰^{۸} CFU $g^{-۱}$ به مدت ۶۰ روز غذادهی شدند. گروه شاهد با جیره فاقد باکتری تغذیه گردید. پس از اتمام دوره، تیمارها به مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک غذادهی 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 ($p<۰/۰۵$). در بقیه مراحل نمونه‌گیری و سایر آنزیم‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($p<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان داد که میزان ۵×۱۰^{۷} کلنی در گرم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در هر گرم خوراک برای دوره ۳۰ روزه و میزان ۵×۱۰^{۸} 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

بـه موازات افزایش آگاهی از ارزش غذایی و بهداشـتی ماهی به خصوص نقش آن در کاهش کلسترول خون، انتظار می‌رود که در آینده تقاضا برای مصرف ماهی افزایش یابد. لذا با توجه به شـرایط کنونی که مزارع پرورش ماهـی، خصوصاً ماهیان گرمابی در حال افزایش می‌باشـند، لزوم افزایش دانش و آگاهی در مورد فن‌آوری زیسـتی این نـوع ماهیان الزامی به نظر می‌رسد. در سطح جهانی، این صنعت از نظر تنوع گونه‌ای و افزایش تراکم و پرورش در حال گسـترش است و در حال حاضر هدف از آبزی پروری به حداکثر رسـاندن راندمان تولید برای بهینه سازی سـودآوری می‌باشد (۹). اسـتفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از دسـت آوردهای مثبت در این زمینـه قلمداد کرد و اخیراً در آبزی پروری نیز متداول گردیده اسـت (۲۰). برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که پروبیوتیک‌ها اثر مفیدی روی مراحل هضـم در حیوانات آبـزی دارند. علاوه براین، بعضـی از باکتری‌ها ممکن است در مراحل هضم دو کفه‌ای‌ها، میگو و ماهی با تولید آنزیم‌های خارج سـلولی نظیر پروتئازها، لیپازها و تولید فاکتورهای ضروری رشـد شرکت نمایند. مشاهدات مشابهی برای فلور میکروبی میگوی چینی (Penaeus chinsis) گزارش شـده اسـت که آنزیم‌های کاملی برای هضم و سـنتز ترکیبات تولید می‌کنند (۴). Giri و همکاران در سال ۲۰۱۳، تأثیر دوزهای مختلف لاکتوباسـیلوس پلانتاروم را در ماهی جـوان Labeo rohita را مورد بررسی قرار دادند. Shyne Anand و همکاران در سال ۲۰۱۳، تأثیر مکمـل غذایی ریز جلبک پریفیتون بر عملکرد رشـد 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 شـیربت یکی از مهم‌ترین ماهیان آب شیرین جنوب کشورمان می‌باشد که کیفیت گوشت و بازار پسندی بالایی دارد و اخیراً امکان پرورش آن در حوضچه‌های خاکی در حال بررسـی اسـت (۱۵). بدیهی اسـت که جهت پرورش ماهیان بومی ملزم به شناسـایی عوامل بیماریزای آن‌ها نیز باشیم. نام علمی این ماهی Barbus grypus می‌باشد. در منابع نام‌های مترادف تورگریپوس و لبوباربوس کوشـچی برای آن ذکر شـده است. نام محلی آن به فارسی شیربت و در زبان عربی شبوط می‌باشد که سابقه ۱۵۰۰ سـاله دارد (۱۵). با توجه به کمبود اطلاعات در مورد استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسـیلوس در ماهیان بومی اسـتان خوزسـتان و افزایش گرایش به استفاده از این باکتری در آبزی‌پروری در کل جهان، بررسی اثر غلظت‌های

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۰۰۷۳، نمابر: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷، Email: T.mohammadian@scu.ac.ir

مختلف آن بـر فاکتورهای رشـدی و آنزیم‌های دسـتگاه گوارش ماهی شیربت هدف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه ماهی: تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی شیربت پرورشی با وزن حدود ۴۰g از منطقه شوشـتر خریداری و با مراعات شـرایط استاندارد انتقال، به سالن آکواریوم دانشکده دامپزشـکی 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 تیماربندی گردیدند. غذادهی با خوراک بیومار به میزان ۳٪ 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.

تیماربنـدی ماهی‌ها: نحوه چیدن حوضچه‌ها، بـه صورت بلوک‌های تصادفـی بود. تغذیه ماهیان براسـاس بیومـاس و درجه حـرارت آب بود. ماهی‌ها بصورت تصادفی به چهار گروه و هر گروه در سـه تکرار تقسـیم بندی گردیدند، بطوری که هر تکرار شامل ۳۰ قطعه بچه ماهی بود. تیمار اول بـا غلظـت ۵×۱۰^{۶} CFU $g^{-۱}$، تیمار دوم با غلظت ۵×۱۰^{۷} CFU $g^{-۱}$ و تیمار سوم با دوز ۵×۱۰^{۸} CFU $g^{-۱}$ لاکتوباسیلوس کازئی تغذیه شدند و تیمار چهارم با خوراک فاقد لاکتوباسیلوس کازئی تغذیه گردید.

نمونه‌گیـری از ماهی‌هـا: نمونه‌بـرداری از تیمارها به صـورت 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 نمونه‌بـرداری در روزهای صفـر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ جهت بیومتری، محاسـبه فاکتورهای رشد و سنجش میزان آنزیم در نظر گرفته شد.

فاکتورهای مورد بررسـی: شاخص‌های رشـد تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر، ۳۰ ، ۶۰ و ۷۵ براساس رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شدند (۲۶):

ضریب رشد ویژه (SGR) = ۱۰۰× (دوره پرورش به روز / Ln w۲ – w۱)

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = میزان کل وزن تر کسـب شـده(g)/ میزان غذای دریافت شده(g)

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

فاکتـور وضعیت (CF) = ۱۰۰× [(طول کل ماهـی L۳ (cm / (وزن ماهی W (g)]

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

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

میزان رشـد نسبی (RGR) = ۱۰۰× (وزن نهایی (g) – وزن اولیه (g) / وزن اولیه (g))

انجام مراحل نمونه‌گیری از دسـتگاه گوارشی: نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان، در روز صفر (اول شروع آزمایش)، ۳۰ ، ۶۰ و ۷۵ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را با اسـتفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبد گشـایی آن‌ها صورت گیرد (۸). سـپس بلافاصله در دمای ۱۹۶°C- (تانک ازت مایع) نگهداری شدند (۱۶).

نمونه‌های فریز شـده، سـریعاً پس از خارج کـردن از تانک ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱g توزین گردید و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشـته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی- حجمی) محلول بافر هموژن برروی 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)، ۱۰۰ Tris-Hcl mM، ۰/۱ EDTA mM، ۱۰۰X Triton، ۰/۱٪ در pH ۷/۸ ترکیب گردید. سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) همـوژن شـدند، نمونه‌هـای هموژن شـده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به داخل اپندورف‌ها ریخته شـده و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴°C سـانتریفیوژ 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 مانیتول ۵۰ mM، بافر ۲ HCl-Tris mM در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی اسـتفاده گردید و به مـدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد (۷). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، کلرید کلسیم ۰/۱ M به هموژن اضافه شـده و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید.

سـنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشـی: فعالیت ۵ آنزیم گوارشی آلفا- آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسـین، 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 براساس پروتئین محلول انجام گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسـین، از سوبسـترای N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N- بنزوئیل-L- آرژنین تبدیل می‌شـود. نتایج در طول موج ۲۵۳nm قرائت نوری صورت گرفت (۱۰). ابتدا ۱۸۰µl از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰µl از اسـید کلریدریک ۱ mM مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمـای ۲۵°C قرار گرفتند. بعد نمونه به میزان ۳۰ µl از نمونه رقیق شـده اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل UV ۲۸۰۲) در طول موج ۲۵۳nm انجام شد.

برای تعیین فعالیت آنزیم کیموتریپسـین از بنزوئیـل- L - تیروزین

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 ۲۵۰µl آب مقطر نیز به لوله دیگری به عنوان شاهد وارد شد. سپس عمل انکوباسیون به مدت ۴-۳ دقیقه در ۲۵°C انجام شد تا به دمای تعادل برسند. سپس ۲۵۰µl از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل انکوباسیون دقیقاً به مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰µl از 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 ۲/۵ml آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰nm 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 Tris-Hcl M ۰/۸، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ mM و معرف تیمول‌فتالئین ۰/۹٪ استفاده شد.

جهت سنجش این آنزیم از کیت آلکالین فسفاتاز (Ref: Zist ۵۰۳-۱۰ Chem.) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بیکربنات را با یک قسمت محلول معرف Para-nitrophenylphosphate M ۰/۱ مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار داده شد تا هم دمایی صورت گیرد. میزان ۰/۵ml 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 ویرایش ۱۶ استفاده شد و تأثیر پروبیوتیک بر عملکرد 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 پروبیتیکی (B) و در روز ۶۰ مربوط به تیمار (C) و (B) بود. ضریب رشد ویژه تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار گرفت، به‌طوری که در روز ۳۰ آزمایش، تیمارهای پروبیتیکی (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 ضریب تبدیل غذایی را داشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فاکتور 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

جدول ۱. مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری (نتایج براساس میانگین± انحراف معیار گزارش شده‌اند). تیمار A: ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی 5×10^{6} CFU g لاکتوباسیلوس کازئی، B: تیمار تغذیه شده با میزان 5×10^{7} CFU g^{-1} باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ، C: تیمار تغذیه شده با میزان 5×10^{8} CFU g^{-1} 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±۰/۴۹ aA	۱۰/۹۶±۰/۴۷ aB	۱۹/۹۱±۰/۶۲ aC
	تیمار B	۳۴/۲۹±۳/۱۷ cA	۴۵/۵۸±۶/۰۹ cAB	۵۱/۳۰±۷/۰۵ cB
	تیمار C	۲۳/۱۱±۱/۰۹ bA	۶۲/۰۰±۰/۸۶ dB	۷۲/۱۰±۱/۰۹ dC
	کنترل	۱۷/۰۵±۶/۰۳ bA	۲۷/۴۳±۴/۰۵ bB	۲۸/۰۲±۰/۸۲ bB
میزان رشد روزانه	تیمار A	۰/۰۶±۰/۰۰۷ aA	۰/۰۸±۰/۰۳ aB	۰/۱۱± ۰/۰۰۳ aC
	تیمار B	۰/۵۴±۰/۰۴ cB	۰/۳۵±۰/۰۳ cA	۰/۳۲±۰/۰۳ cA
	تیمار C	۰/۲۴±۰/۰۱ bA	۰/۳۲±۰/۰۰۲ cC	۰/۳۰±۰/۰۰۲ cB
	کنترل	۰/۲۶±۰/۰۸ bA	۰/۲۱±۰/۰۲ bA	۰/۱۷±۰/۰۰۲ bA
ضریب رشد ویژه	تیمار A	۰/۰۶±۰/۰۰۶ aA	۰/۰۷±۰/۰۰۳ aB	۰/۱۰±۰/۰۰۳ aC
	تیمار B	۰/۴۲±۰/۰۳ cB	۰/۲۷±۰/۰۳ cA	۰/۲۳±۰/۰۲ cA
	تیمار C	۰/۳۰±۰/۰۱ bA	۰/۳۴±۰/۰۰۳ dB	۰/۳۱±۰/۰۰۳ dA
	کنترل	۰/۲۲±۰/۰۷ bA	۰/۱۷۵±۰/۰۲ bA	۰/۱۴±۰/۰۰۳ bA
ضریب تبدیل غذایی	تیمار A	۵/۳۹±۰/۶۵ bB	۲/۹۶±۰/۱۲ cA	۲/۲۰±۰/۰۶ bA
	تیمار B	۰/۸۰±۰/۰۶ aA	۱/۲۲±۰/۱۳ bB	۲/۲۰±۰/۲۴ bC
	تیمار C	۱/۰۹±۰/۰۴ aC	۰/۶۷±۰/۰۰۵ aA	۰/۸۷±۰/۰۰۸ aB
	کنترل	۱/۰۹±۰/۳۹ aA	۱/۳۹±۰/۱۷ bA	۳/۱۶±۰/۰۳ cB
فاکتور وضعیت	تیمار A	۰/۳۹±۰/۰۷ bB	۰/۲۴±۰/۱۰ aAB	۰/۰۸±۰/۰۵ aA
	تیمار B	۳۴/۲۹±۰/۰۱ aA	۰/۴۱±۰/۰۵ bB	۰/۲۳±۰/۰۴ bA
	تیمار C	۰/۷۴±۰/۰۷ cC	۰/۳۶±۰/۰۵ abB	۰/۰۸±۰/۰۵ aA
	کنترل	۰/۵۱±۰/۰۸ bA	۰/۳۷±۰/۰۶ abA	۰/۳۵±۰/۰۳ cA
میزان کارایی پروتئین	تیمار A	۰/۳۸±۰/۰۴ aA	۰/۷۰±۰/۰۲ aB	۰/۹۴±۰/۰۲ bC
	تیمار B	۲/۵±۰/۱۲ bC	۱/۷۱±۰/۱۷ bB	۰/۹۵±۰/۱۰ bA
	تیمار C	۱/۹۱±۰/۰۷ bA	۳/۰۶±۰/۰۲ cC	۲/۳۷±۰/۰۲ cB
	کنترل	۲/۰۷±۰/۶۹ bB	۱/۵۰±۰/۱۸ bB	۰/۶۵±۰/۰۷ aA

غذادهی 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 غذادهی، 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 غذادهی پروبیوتیکی، میزان کیموترپسین در تمام تیمارها کاهش یافت.

بیشترین میزان ترپسین 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. روز ۷۵ پس از قطع غذادهی 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 آلکالاین فسفاتاز را دارد. روز ۷۵ پس از قطع غذادهی 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

جدول ۲. مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری (نتایج براساس میانگین± 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±۰/ ۴۲ aAB	۰/۸۰±۰/۲۱ abAB	۰/۵۱±۰/۲۱ bA	۱/۲۰±۰/۶۱ bB
	تیمار B	۰/۶۱±۵/۲۰ aB	۰/۶۱±۰/۱۸ aB	۰/۲۱±۰/۰۴ aA	۰/۵۶±۰/۱۳ aB
	تیمار C	۰/۴۱±۰/۱۴ aB	۰/۶۳±۰/۰۸ aC	۰/۲۰±۰/۰۸ aA	۰/۶۵±۰/۱۸ aC
	کنترل	۰/۵۴±۰/۱۹ aA	۰/۸۹±۰/۲۵ bB	۰/۳۱±۰/۰۴ aA	۰/۵۱±۰/۱۸ aA
لیپاز	تیمار A	۱/۱۰±۰/۵۱ aA	۱/۵۹±۰/۳۴ aA	۲/۲۴±۰/۴۱ aA	۱/۲۰±۱/۵۰ bB
	تیمار B	۱/۲۳±۰/۵۵ abA	۲/۴۵±۱/۸۳ abA	۱/۵۷±۰/۲۶ aA	۰/۵۶±۰/۴۷ aA
	تیمار C	۱/۲۸±۰/۶۷ abA	۳/۷۸±۱/۷۳ bB	۱/۳۵±۰/۲۷ aA	۰/۶۵±۰/۳۳ aA
	کنترل	۱/۷۹±۰/۲۲ bA	۲/۷۶±۰/۴۶ abA	۲/۱۰±۱/۴۵ aAB	۰/۵۱±۰/۲۴ aA
کیموترپسین	تیمار A	۰/۱۱±۰/۰۵ aB	۰/۱۲±۰/۰۳ aB	۰/۰۵±۰/۰۲ aA	۰/۱۸±۰/۰۶ bC
	تیمار B	۰/۱۸±۰/۰۷ aA	۰/۲۶±۰/۰۶ bA	۰/۵۰±۰/۱۱ bB	۰/۱۸±۰/۰۶ bA
	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 bB	۰/۲۳±۰/۰۶ bAB
ترپسین	تیمار A	۱/۸۳±۰/۹۹ aA	۲/۵۸±۰/۷۶ bc	۱/۳۹±۰/۳۲ aA	۸/۸۸±۳/۲۲ bB
	تیمار B	۱/۷۲±۰/۶۳ aB	۱/۵۱±۰/۷۴ abAB	۰/۷۲±۰/۲۰ aA	۳/۱۵±۱/۲۶ aC
	تیمار C	۱/۷۴±۰/۶۲ aA	۳/۲۰±۱/۵۴ cAB	۳/۳۷±۱/۸۱ bB	۳/۰۷±۰/۸۷ aAB
	کنترل	۱/۶۵±۰/۲۳ aAB	۱/۱۰±۰/۶۹ aA	۲/۴۳±۰/۶۳ bBC	۲/۳۰±۰/۹۴ aC
آلکالین فسفاتاز	تیمار A	۲۸۹/۰۳±۲۴/۲۵ aB	۴۵±۲۱/۵۹ aA	۳۶/۶±۷/۲۵ aA	۲۷۷/۷۲±۱۳۷/۹۵ cB
	تیمار B	۲۱۷/۰۸±۳۹/۰۷ aB	۳۱±۱۸/۶۱ aA	۲۷/۷۸±۸/۷۹ aA	۵۹/۹۱±۲۰/۴۴ aA
	تیمار C	۲۳۲/۴۹±۱۴۷/۱۳ aB	۵۴±۱۷/۸۸ aA	۱۳۶/۱۵۶±۴۵/۳۹ bAB	۶۲/۲۴±۱۴/۵۴ aA
	کنترل	۲۳۸/۹۸±۱۲۶/۸۷ aB	۵۰±۱۶/۵۰ aA	۱۴۱/۵۵±۸۳/۳۶ bAB	۱۷۲/۷۳±۵۳/۷۴ bAB

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، WG و FCR در مدت ۶۰ روز افزایش معنی‌داری را نشان دادند، به طوری که در غلظت 10^{8} , 10^{10} CFU g^{-1}، SGR به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (۱۱). هم‌چنین نتایج مشابهی توسط Venkat و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر میگوی روزنبرگی، Aly و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر تیلاپیای نیل، Al-Dohail و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر گربه ماهی گاپرینوس، Sun و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر ماهی‌هامور 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 و همکاران در سال ۲۰۰۰، Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز مشابه می‌باشد (۱۲، ۲۲).

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 5×10^{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، دلبروکئی، رامانسوس)، 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 cerevisiaevar 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. cerevisiaevar* نتایج مشابهی را گزارش نمودند (۱۸). Ramos

و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۲ پروبیوتیک تجاری را به صورت جداگانه در قزل‌آلای رنگین‌کمان 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 نورس که از مکمل غذایی فروکتوالیگوساکارید که نوعی پربیوتیک 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 شیربت 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 روز۳۰ 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 شیربت 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 بالایی از لیپاز، ترپسین و کیموترپسین 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). همین طور 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، 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 وC) به این وسیله توانسته‌اند سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره غذایی بچه ماهیان شیربت 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. chinesis (۳۷)، ماهی کلمه Rutilus rutilus (۲۷)، شانک (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 شیربت 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 پربیوتیک 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 شیربت 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 کربوهیدرات غذاهای 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 cervisiae 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

Fenneropenaeus indicus تأثیری بر فعالیت آنزیم لیپاز نداشــته 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 گوارشــی، مورد اســتفاده واقع شــود. با توجه به تولید آنزیم‌های گوارشی توسط دســتگاه 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 توســط بچه ماهیان را تفکیک نمود (۳۲). بهبود شاخص‌های رشدی در ماهیان تغذیه شــده با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی احتمالاً به بهبود فعالیت‌های گوارشــی به وسیله‌ی سنتز ویتامین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌ها مرتبط می‌باشد که منجر به بهبود هضم‌پذیری و افزایش وزن شده اســت. هم‌چنین کاهش ضریب تبدیل غذایــی در مطالعه‌ی حاضر بیانگر بهبود کارایی استفاده از مواد غذایی در زمانی است که لاکتوباسیلوس کازئی در دوره‌هــای ۳۰ و ۶۰ روزه به ترتیب در غلظت‌هــای ۵×۱۰^{۷} CFU $g^{-۱}$ و ۵×۱۰^{۸} CFU $g^{-۱}$ استفاده شده است.

در دوره ۳۰ روزه غلظتB، بهترین عملکرد رشــد را داشــته 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.

References

1. Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A., Shalaby, A.M. (2009) Micrococcus luteus and Pseudomonas spcies 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 concentrationin 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-Zarzuela, 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: 109-11.
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 aeguifasciata. Aquaculture. 203: 321-333.
9. Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. (2009) Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in 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 larvala quatic organisms. Aquaculture. 191: 259-270.

13. Hosseinifar, S.H., Mirvaghefi, A.R., Majazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H.A., PourAmini, 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. ,Guzma´n-Me´ndez, B., Lo´pez-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 growthperformance 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 impoved 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., Küçüksari, H. (2008) Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead 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 postlarvae 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, Enteroccus 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) Worthigton Enzyme Manual Related Biochemical. (3rd ed.) Freehold, New Jersy, 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]

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

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

[3]*Khouzestan 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, trypsine 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, digestiv enzymes activity, probiotic

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Comparison growth factors between trial treatments in different steps of sampling priod. 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 ± 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 priod. fed with diet containing 5×106 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 ± 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**