

"مقاله پژوهشی"

اثر پروبیوتیک‌های *Lactococcus lactis* و *Weissella cibaria* بر عملکرد رشد، فلور باکتریایی روده، آنزیم‌های گوارشی و بافت روده در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

اردوان بخش زاد محمودی^۱، مسعود فرخ روز^{۱*}، عباسعلی زمینی^۱، علیرضا شاور ماسوله^۲، اکرم تهرانی فرد^۳

۱. گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۳. گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۲

چکیده

هدف از انجام تحقیق حاضر، تعیین اثر پروبیوتیک‌های *Lactococcus lactis* و *Weissella cibaria* بر عملکرد رشد، فلور باکتریایی روده، آنزیم‌های گوارشی و بافت روده در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه $1/3 \pm$ گرم در ۱۰ تیمار با ۳ تکرار تقسیم بندی شدند. در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۱، ۲ و ۳ از *L. lactis* به میزان CFU/g 10^{11} در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا، در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۴، ۵ و ۶ از *W. cibaria* به میزان CFU/g 10^{11} در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا، در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۷، ۸ و ۹ از ترکیب این دو باکتری پروبیوتیکی به‌طور مساوی در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا استفاده شد و ماهیان تیمار ۱۰ (شاهد) از غذای فاقد پروبیوتیک استفاده نمودند. غذادهی ۸ هفته به طول انجامید. زیست‌سنجی در ابتدا و انتهای دوره جهت تعیین شاخص‌های رشد صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری سطوح آنزیم‌های گوارشی نیز در پایان دوره از ماهیان خونگیری بعمل آمد. فلور باکتریایی روده و بررسی بافت‌شناسی روده نیز در پایان انجام شد. نتایج بررسی حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار میزان افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، میانگین رشد روزانه و کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی در اغلب تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با شاهد بود ($P < 0/05$). همچنین کمترین میزان آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در تیمار شاهد مشاهده شد. تعداد باکتری‌های اسید لاکتیکی رشد یافته در روده ماهیان دریافت‌کننده پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0/05$). در نهایت مشخص شد که استفاده از این پروبیوتیک‌ها خصوصاً به صورت ترکیبی و به میزان ۳۰۰ mg/kg و پس از آن استفاده از ۳۰۰ mg/kg پروبیوتیک *W. cibaria* سبب بهبود عملکرد رشد، تغذیه، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بهبود فلور میکروبی روده و افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک روده در بچه ماهی کپور معمولی می‌گردند.

کلمات کلیدی: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، پروبیوتیک، *Lactococcus lactis* و *Weissella cibaria*، شاخص رشد، آنزیم گوارشی، فلور باکتریایی روده

مقدمه

نیاز بشر به غذا به ویژه پروتئین باعث شده است تا به پرورش و مصرف آبزیان از جمله ماهی ها، روی آورد. جهت تامین این نیاز و افزایش تولید محصولات آبی، معمولاً تلاش می گردد تا میزان تولید در واحد سطح و تراکم آبزیان پرورشی در محیط افزایش یابد. رشد سریع، بهبود کارایی تغذیه و افزایش مقاومت در برابر بیماری ها از اهداف مهم صنعت آبی پروری محسوب می شوند. توسعه پایدار این صنعت نیازمند به کارگیری فنون جدیدی است که از آن جمله می توان به استفاده از پروبیوتیک ها در جهت ارتقای عملکرد آبزیان پرورشی اشاره نمود (محمودی کیا و ایمانی، ۱۳۹۷). مطالعات زیادی در رابطه با اثر پروبیوتیک ها بر روی گونه های مختلف آبزیان و ماهیان صورت گرفته است (آذری تاکامی و همکاران، ۱۳۹۱؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۵؛ هاشمی منفرد و همکاران، ۱۳۹۵؛ برغمان و همکاران، ۱۳۹۸؛ لشتو آقایی و همکاران، ۱۳۹۹؛ Xuxia et al., 2016; Beck et al., 2015; 2010; Won et al., 2020; Mohammadian et al., 2019; اما به نظر می رسد نکات بسیار زیادی در قابلیت آن ها در افزایش کارایی پرورش ماهیان هنوز وجود داشته باشد که نیازمند انجام تحقیقات مستمر می باشد. باکتری های پروبیوتیک، مکمل های غذایی میکروبی زنده می باشند که نقش سودمندی را برای جانور میزبان از طریق ایجاد تغییرات میکروبی در روده ایفا می کنند (Fuller, 1989). به طور کلی پروبیوتیک ها از نظر سویه میکروبی مؤثرشان به سه گروه عمده پروبیوتیک های باکتریایی، قارچی و مخمری تقسیم بندی می شوند. پروبیوتیک های باکتریایی عمده ترین پروبیوتیک هایی اند که تاکنون در آبی پروری

استفاده شده اند و اثرات مثبت آنها به اثبات رسیده است. در این بین، پروبیوتیک های حاوی باکتری های اسیدلاکتیک فواید بیشماری دارند. بطوریکه به افزایش میزان زنده مانده میزبان در مواجهه با عوامل بیماریزا کمک می نمایند، سبب تقویت سیستم ایمنی می گردند (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱)، اشتها را افزایش می دهند و افزایش کلی در وزن و بهبود عملکرد رشد و تغذیه را در ماهی سبب می شوند (محمودی کیا و ایمانی، ۱۳۹۷). باکتری های *L. lactis* و *W. cibaria* از جمله باکتری های پروبیوتیکی هستند که تأثیر آنها بر برخی از گونه های ماهیان مورد بررسی قرار گرفته اند. از جمله مطالعات انجام شده در رابطه با گونه اول می توان به بررسی های انجام شده توسط شناور ماسوله، ۱۳۹۱ در تاسماهی ایرانی و برغمان و همکاران، ۱۳۹۸ در کپور معمولی اشاره نمود. در رابطه با مطالعات انجام شده مرتبط با گونه دوم می توان به تحقیقات انجام شده توسط هاشمی منفرد و همکاران، ۱۳۹۵ در تاس ماهی سبیری اشاره نمود.

کپورماهیان گروهی از با ارزش ترین ماهیان آب شیرین از لحاظ اقتصادی می باشند و فراوانی بسیار زیادی در آب های شیرین دارند. گونه های متعددی از این ماهیان به صورت گسترده در سرتاسر نقاط دنیا، مورد تکثیر و پرورش قرار می گیرند که کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از چندین گونه از کپور ماهیان پرورشی با ارزش اقتصادی است و احتمالاً اولین گونه از ماهیان است که از زادگاهش به سایر نقاط دنیا معرفی شده است (Billard, 1995). این ماهی، یکی از عمده ترین ماهیان گرم آبی تولیدی در ایران و جهان است و شناخت راهکارهای مناسب و جدید برای بهبود شرایط تولید و پرورش آن، کمک قابل توجه و موثری

در جهت تولید این گونه با ارزش می‌نماید، خصوصاً اینکه میزان تلفات بالای بچه ماهیان یکی از مهم ترین چالش های این صنعت است که هزینه های هنگفتی را به همراه دارد. از این رو در این مطالعه نظر به اهمیت پروبیوتیک ها در آبی پروری، به بررسی تأثیر جیره های غذایی حاوی باکتری های پروبیوتیکی *W.cibaria* و *L.lactis* بر شاخص های رشد، آنزیم های گوارشی، فلور باکتریایی، بافت های روده و کبد در بچه ماهیان کپور معمولی پرداخته شده است تا گامی در جهت ارتقای صنعت پرورش این گونه با ارزش برداشته شود.

مواد و روش ها

بچه ماهیان کپور معمولی با میانگین وزن اولیه $17 \pm 1/3$ گرم، جهت انجام این تحقیق خریداری شدند که پس از گذراندن دوران دو هفته ای سازگاری، به صورت تصادفی در ۳۰ مخزن تقسیم بندی شدند. وان ها ۶۰۰ لیتری شست و شو و به میزان ۳۵۰ لیتر آب گیری شده بود. ماهی ها در ۹ تیمار و یک شاهد که هر یک دارای ۳ تکرار بود، مورد بررسی قرار گرفتند. جهت کنترل شرایط پرورش، مقادیر درجه حرارت توسط دماسنج الکلی، اکسیژن توسط دستگاه اکسیژن متر و pH با استفاده از pH متر به صورت روزانه و فاکتورهای آمونیوم و سختی آب به صورت هفتگی توسط دستگاه دیجیتال و کیت های آماده در کلیه مخازن ها اندازه گیری شد (رضایی تبار و همکاران، ۱۳۹۶). مقادیر درجه حرارت، اکسیژن، pH، آمونیوم و سختی به ترتیب برابر با ۲۴/۵ درجه سانتی گراد، ۶/۱ میلی گرم در لیتر، ۷/۷، ۲ میلی گرم در لیتر و ۲۱۲/۲۵ میلی گرم در لیتر بود. علاوه بر این فاکتورهای آب،

شرایط متغیرهایی همچون سطح بستر، میزان شدت نور، استرس و نوع غذا و... یکسان بود.

باکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* بودند که با توجه به تیمار بندی، به صورت مجزا یا ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تیمار بندی ماهیان، از سه جیره غذایی که باکتری های *Weissella cibaria* به میزان 10^{10} CFU/g، *Lactococcus lactis* به میزان 10^{10} CFU/g و ترکیب این دو باکتری به بطور مساوی به آن افزوده شده بود، استفاده شد (شناور ماسوله، ۱۳۹۱). میزان مصرف باکتری ها در سه دوز مختلف به میزان ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا بود که برای ۹ تیمار در نظر گرفته شد. در واقع در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۱، ۲ و ۳ از *Lactococcus lactis* به میزان 10^{10} CFU/g در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا، در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۴، ۵ و ۶ از *Weissella cibaria* به میزان CFU/g 10^{10} ، در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا، در تهیه غذای ماهیان تیمارهای ۷، ۸ و ۹ از ترکیب این دو باکتری پروبیوتیکی به بطور مساوی در سه دوز ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در هر یک کیلوگرم غذا استفاده شد و ماهیان تیمار ۱۰ (شاهد) از غذای فاقد پروبیوتیک استفاده نمودند.

برای تهیه جیره های غذایی هر تیمار، دوز مشخصی از پودر باکتری یا باکتری های مورد استفاده در هر تیمار در زیر هود لامینار در ظروف پلاستیکی استریل توزین و با ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید. محلول ساخته شده بر روی غذای پلت اسپری شده و سپس غذای حاوی باکتری در داخل

دستگاه فن (Fan Azma Gostar) در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک شد و بعد از خشک شدن در داخل یخچال (۶ درجه سانتی-گراد) قرار داده شد و فقط در مواقع غذادهی به میزان مورد نیاز خارج شده و بعد از چند دقیقه غذاها به ماهیان خورانده می‌شد (شناور ماسوله، ۱۳۹۱). غذادهی بصورت روزانه در سه وعده صبح، ظهر و عصر برحسب ۳ درصد وزن توده زنده انجام شد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵). مدت زمان غذا دهی با جیره های آزمایشی، ۸ هفته به طول انجامید. برای اندازه گیری فاکتورهای رشد و تغذیه و همچنین محاسبه میزان غذای مورد نیاز، همه بچه ماهیان هر دو هفته یک بار مورد زیست سنجی قرار گرفتند. بطوریکه وزن کل با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و طول چنگالی با استفاده از خط کش با دقت ۱ میلی متر اندازه گیری شد. سپس مقادیر شاخص های افزایش وزن بدن (BWI)، درصد افزایش وزن بدن (PBWI)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب چاقی (CF) و میزان رشد روزانه (ADG) به کمک معادلات ریاضی (Merrifield et al., 2011; Mazurkiewicz et al., 2008) محاسبه شد.

پس از پایان ۸ هفته غذادهی با جیره های غذایی مشخص، خونگیری از ماهیان، به طور تصادفی انجام شد. ابتدا ماهیان با پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند (ذریه زهرا و همکاران، ۱۳۹۲). خون گیری با کمک سرنگ انسولین هپارینه از سرخرگ یا سیاهرگ دمی انجام شد. نمونه های خون سریعاً در یک کلمن حاوی یخ خشک و به دور از تکان های شدید به آزمایشگاه ارسال شد (Torfi Moazenzadeh et al., 2015). آنزیم های گوارشی شامل آنزیم های آمیلاز،

لیپاز، پروتئاز به ترتیب به روش های ارائه شده توسط Ross و همکاران (۲۰۰۰)، Shihabi و Bishop (۱۹۷۱) و Bernfeld (۱۹۵۵) اندازه گیری گردیدند.

به منظور ارزیابی فلورباکتریایی روده و باکتری های اسید لاکتیک، پس از پایان ۸ هفته تغذیه با جیره های غذایی، از هر تیمار به طور تصادفی، ۳ ماهی انتخاب شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. ماهیان ابتدا با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش گردیدند. سپس سطح شکمی آنها با الکل ۷۰٪، استریل گردید و زیر هود لامینار و در کنار شعله، نسبت به کالبد گشایی آنها، اقدام شد و روده به طور کامل جداسازی گردید. سپس روده کاملاً باز شد و پس از تخلیه محتویات آن، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل سه بار مورد شستشو قرار گرفت. محتویات روده پس از توزین در داخل ظروف استریل، با استفاده از سرم فیزیولوژی رقیق گردید. رقت های مورد نظر تهیه شد در مراحل بعدی، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به وسیله سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت های تریپتیک سوی آگار (TSA) جهت شمارش تعداد کل باکتری ها و محیط کشت MRS جهت شمارش لاکتوباسیلوس ها، به روش کشت سطحی تلقیح انجام شد و پلیت ها در دمای ۳۰ - ۳۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس کلنی های تشکیل شده بر روی پلیت در زیر کلی کانتر، شمارش گردیدند و تعداد آنها با احتساب رقت مورد استفاده، مشخص گردید و بر اساس CFU (Colony Forming Unit) گزارش شد (Ringo and Gatesoupe, 1998; Mahious et al., 2006).

جهت بررسی بافت شناسی از بافت روده ماهی ها، نمونه های بافتی تهیه شد. بدین منظور ابتدا ماهیان با

تفکیکی Tukey در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل بیشترین مقدار افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و میانگین رشد روزانه در تیمار ۸ و پس از آن در تیمار ۵ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند ($P < 0.05$). کمترین میزان آنزیم‌های گوارشی و نیز کمترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیکی رشد یافته در محیط کشت MRS در تیمار شاهد مشاهده شد که با اغلب تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۱ تا ۳).

نتایج کلی مربوط به بافت شناسی روده نشان داد که روده در ماهیان گروه شاهد دارای مورفولوژی طبیعی است و در هیپچیک از تیمارها، آسیب بافتی در روده مشاهده نشد. در ماهیان تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک در جیره‌های غذایی، افزایش طول پرزها، ارتفاع اپی‌تلیوم، و افزایش لنفوسیت‌های بین سلول‌های پوششی، افزایش سلول‌های جامی شکل و آستر مخاط دیده شد.

استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش و سپس کشته شدند و پس از کالبد گشایی از روده آنها نمونه برداری شد. نمونه‌های بافت جهت انجام بررسی‌های بافت شناسی، در محلول بوئن تثبیت گردیدند. برای نگهداری، در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از انجام مراحل معمول بافت شناسی (ثبوت، آبگیری، شفاف سازی، قالب گیری، برش، رنگ آمیزی و مونته کردن) در آزمایشگاه، برش‌هایی با ضخامت ۴-۶ میکرون از بافت‌ها تهیه و رنگ آمیزی شد (شریف پور و حلاجیان، ۱۳۹۴). روش مورد استفاده در این مطالعه، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بود. مرحله عکسبرداری، پس از رنگ آمیزی انجام شد و اسلایدهای بافتی به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین مورد مطالعه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 20) انجام شد و نمودارها با استفاده از Excel رسم گردید. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس با آزمون لون کنترل گردید. جهت مقایسه داده‌های خونی و ضرایب رشد از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون

جدول ۱: میزان شاخص های رشد و بقاء بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های مختلف

شاخص تیمار	WG (گرم)	PBWR (%)	SGR (%)	FCR (%)	CF (%)	ADG (گرم)
۱	20.04 ± 0.87^{bc}	54.41 ± 0.46^{cde}	$1/40 \pm 0.02^{cd}$	$2/25 \pm 0.06^{ab}$	$2/58 \pm 0.02$	0.36 ± 0.01^{cd}
۲	18.93 ± 0.56^{ab}	$53/15 \pm 0.36^{bc}$	$1/35 \pm 0.02^{bc}$	$2/16 \pm 0.09^a$	$2/58 \pm 0.02$	0.34 ± 0.01^{bc}
۳	18.53 ± 0.08^{ab}	$51/70 \pm 0.05^{ab}$	$1/30 \pm 0.00^{ab}$	$2/22 \pm 0.05^{ab}$	$2/60 \pm 0.01$	0.33 ± 0.00^{ab}
۴	$21/00 \pm 0.40^{cd}$	$55/00 \pm 0.66^{cde}$	$1/43 \pm 0.03^{cde}$	$2/26 \pm 0.08^{ab}$	$2/63 \pm 0.12$	0.37 ± 0.01^{cde}
۵	$23/18 \pm 0.78^{ef}$	$57/56 \pm 1/02^{fg}$	$1/53 \pm 0.04^{fg}$	$2/13 \pm 0.09^a$	$2/55 \pm 0.02$	0.42 ± 0.02^{fg}
۶	$20/30 \pm 0.96^{bcd}$	$54/04 \pm 1/16^{cd}$	$1/39 \pm 0.05^{cd}$	$2/26 \pm 0.05^{ab}$	$2/57 \pm 0.02$	0.36 ± 0.02^{cd}
۷	$22/25 \pm 0.33^{de}$	$56/54 \pm 0.49^{efg}$	$1/49 \pm 0.02^{efg}$	$2/19 \pm 0.03^a$	$2/61 \pm 0.03$	0.40 ± 0.01^{ef}
۸	$24/30 \pm 0.42^f$	$58/58 \pm 0.45^g$	$1/57 \pm 0.02^g$	$2/12 \pm 0.07^a$	$2/56 \pm 0.05$	0.43 ± 0.01^g
۹	$22/07 \pm 1/04^{de}$	$56/15 \pm 0.99^{def}$	$1/47 \pm 0.04^{def}$	$2/14 \pm 0.08^a$	$2/58 \pm 0.01$	0.39 ± 0.02^{def}
۱۰	$17/06 \pm 0.81^a$	$49/90 \pm 1/16^a$	$1/23 \pm 0.04^a$	$2/43 \pm 0.06^b$	$2/59 \pm 0.02$	0.31 ± 0.02^a

اعداد دارای بالانویس متفاوت در یک ستون، دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

جدول ۲: آنزیم های گوارشی در بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های مختلف

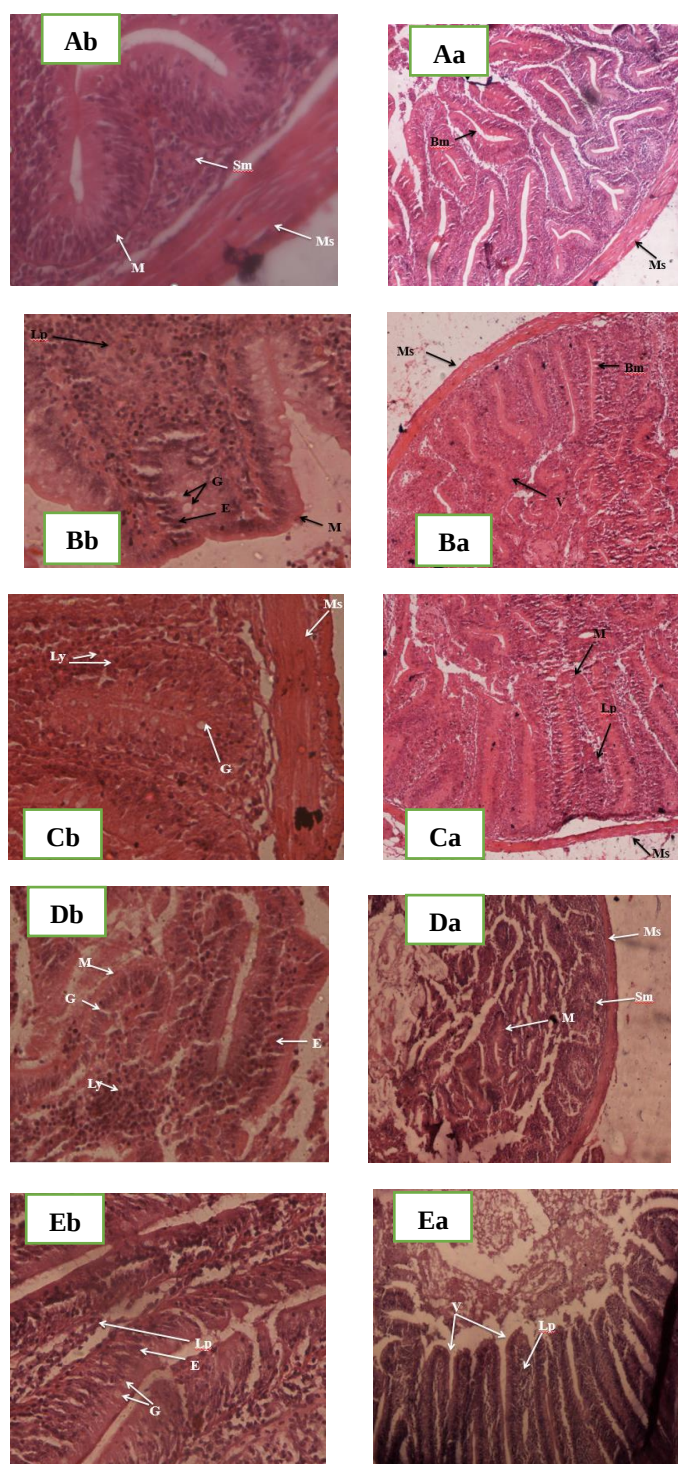
شاخص تیمار	آمیلاز (U/l)	لیپاز (U/l)	پروتئاز (U/l)
۱	60.33 ± 0.33^b	$17/00 \pm 0.57^{ab}$	$37/00 \pm 1/52^{ab}$
۲	$58/33 \pm 5/04^b$	$16/33 \pm 0/88^{ab}$	$40/66 \pm 1/45^{ab}$
۳	$59/66 \pm 2/33^b$	$17/00 \pm 0/57^{ab}$	$40/33 \pm 2/84^{ab}$
۴	$54/66 \pm 1/20^b$	$16/66 \pm 0/33^{ab}$	$38/00 \pm 0/57^{ab}$
۵	$59/33 \pm 0/66^b$	$18/33 \pm 0/57^{ab}$	$40/00 \pm 0/33^b$
۶	$60/33 \pm 0/88^b$	$20/00 \pm 1/15^b$	$45/00 \pm 0/57^c$
۷	$62/00 \pm 0/57^b$	$14/66 \pm 0/33^a$	$39/00 \pm 3/57^{ab}$
۸	$63/66 \pm 2/18^b$	$18/00 \pm 0/57^{ab}$	$41/33 \pm 2/57^{ab}$
۹	$60/00 \pm 2/51^b$	$19/66 \pm 1/25^b$	$40/00 \pm 3/60^{ab}$
۱۰	$40/66 \pm 4/09^a$	$12/00 \pm 0/57^a$	$30/33 \pm 2/60^a$

اعداد دارای بالانویس متفاوت در یک ستون، دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

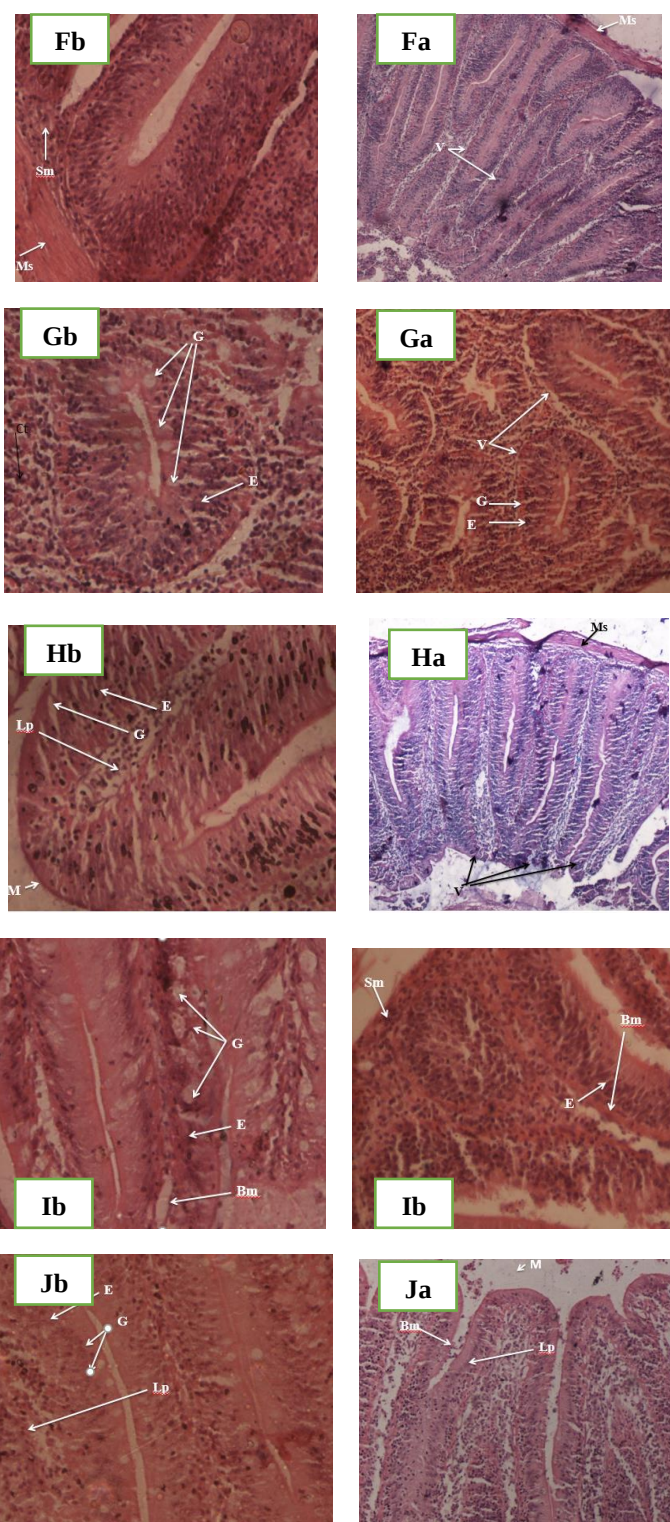
جدول ۳: تعداد باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت های TSA و MRS در بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های مختلف

شاخص کلنی رشد یافته در محیط کشت TSA (CFU/g)	کلنی رشد یافته در محیط کشت MRS (CFU/g)	تیمار
$6/07 \pm 0/01^a$	$3/83 \pm 0/01^b$	۱
$6/50 \pm 0/01^f$	$3/94 \pm 0/01^b$	۲
$6/28 \pm 0/02^{bcd}$	$3/97 \pm 0/02^b$	۳
$6/36 \pm 0/02^{cde}$	$4/16 \pm 0/06^b$	۴
$6/24 \pm 0/02^b$	$4/03 \pm 0/02^b$	۵
$6/38 \pm 0/05^{de}$	$3/98 \pm 0/01^b$	۶
$6/27 \pm 0/07^{bc}$	$3/94 \pm 0/08^b$	۷
$6/25 \pm 0/01^b$	$3/98 \pm 0/05^b$	۸
$6/37 \pm 0/05^{cde}$	$3/91 \pm 0/02^b$	۹
$6/43 \pm 0/03^{ef}$	$2/46 \pm 0/15^a$	۱۰

اعداد دارای بالانویس متفاوت در یک ستون، دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0/05$).



شکل ۱: بافت روده ماهی کپور معمولی در تیمارهای تغذیه شده با غذای حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک های *L. lactis* و *W. cibaria* تیمارهای ۱ تا ۱۰ به ترتیب در شکل های A تا J نشان داده شده اند. حروف a و b در هر تصویر به ترتیب نشان دهنده ی بزرگنمایی های ۱۰۰x و ۴۰۰x هستند. M: موکوس، Ms: عضلانی، Bm: غشای پایه، V: پرز روده، Sm: لایه زیر موکوسی، Lp: آستر مخاط، G: غده جامی شکل، E: سلول انتروسیست، Ly: لنفوسیت. رنگ آمیزی H & E



ادامه شکل ۱: بافت روده ماهی کپور معمولی در تیمارهای تغذیه شده با غذای حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک های *L lactis* و *W.cibaria* تیمارهای ۱ تا ۱۰ به ترتیب در شکل های A تا J نشان داده شده اند. حروف a و b در هر تصویر به ترتیب نشان دهنده ی بزرگنمایی های ۱۰۰X و ۴۰۰X هستند. M: موکوس، Ms: عضلاتی، Bm: غشای پایه، V: پرز روده، Sm: لایه زیر موکوسی، Lp: آستر مخاط، G: غده جامی شکل، E: سلول انتروسیست، Ly: لنفوسیت. رنگ آمیزی H & E

بحث

نتایج بررسی عملکرد رشد و تغذیه در یک نگاه نشان داد که هرچند تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک‌ها، نسبت به تیمار شاهد، عملکرد رشد و تغذیه بسیار بهتری داشتند. اما در بین آنها، ماهیانی که با غذای حاوی ترکیبی از پروبیوتیک‌های *W.cibaria* و *L.lactis* به میزان ۳۰۰ mg/kg تغذیه شده بودند (تیمار ۸)، و نیز ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *W.cibaria* به میزان ۳۰۰ mg/kg (تیمار ۵) نسبت به سایر تیمارها شرایط رشد و تغذیه مطلوب‌تری داشتند.

مشابه با نتایج تحقیق حاضر، اثرات مثبت و مطلوب پروبیوتیک‌های مختلف در بهبود و افزایش عملکرد رشد در تحقیقات دیگر نیز اثبات شده اند. از جمله تحقیقات انجام شده در رابطه با بچه ماهی کپور معمولی می‌توان به اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیک باکتوسل (قبادی و همکاران، ۱۳۹۳)، لاکتوباسیلوس‌های (*L. bulgaricus* و *L. casei plantarum*) (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵)، پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* (اینالو و همکاران، ۱۳۹۸) و پروبیوتیک *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (برغمان و همکاران، ۱۳۹۸) در این گونه، و در سایر ماهیان نیز به اثرات مثبت پروبیوتیک *L.lactis* در ماهی تیلاپای نیل (*Xuxia* et al., 2010)، پروبیوتیک *W.cibaria* در تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) (هاشمی منفرد و همکاران، ۱۳۹۵)، ترکیب دو نوع پروبیوتیک *Lactobacillus* و *Lactococcus lactis* BFE920 (*plantarum* FGL0001) (Beck et al., 2015) و نیز پروبیوتیک *L.lactis* WFLU12 (Nguyen et al., 2017) در کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys*

olivaceus) بر عملکرد رشد و تغذیه اشاره نمود. هر چند مثال‌های ذکر شده در بالا، بیانگر اثرات مثبت پروبیوتیک‌های مصرفی در غذای ماهیان بوده اند اما باید اذعان نمود که مشاهده تفاوت در نتایج در مطالعات مختلف به نوع پروبیوتیک مصرفی، شکل مکمل مصرفی، حامل انتقال دهنده پروبیوتیک، دوز مورد استفاده، مدت زمان تغذیه با پروبیوتیک و اندازه ماهی مورد آزمایش، مرتبط است (Olsen et al., 2001; Mohapatra et al., 2012; Yazici et al., 2015).

علت عملکرد مناسب رشد و تغذیه می‌تواند به افزایش میزان اشتهای ماهیان به دلیل تحریک سیستم گوارشی و نتیجتاً افزایش راندمان دستگاه گوارش، افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بهبود تعادل میکروبی روده، هضم و جذب بهتر مواد غذایی و نتیجتاً افزایش رشد، مرتبط باشد. همچنین پروبیوتیک‌ها آنزیم‌های خارج سلولی متعددی ترشح می‌کنند و با پشتیبانی از آنزیم‌های گوارشی و مواد مغذی معین، رشد را بهبود می‌بخشند (Farzanfar et al., 2007). چراکه پروبیوتیک‌ها باعث ساخت متابولیت‌های میکروبی زیست فعال مانند ویتامین‌ها و پپتیدهای زیست فعال، اسیدهای آلی و اسیدهای چرب در طول تخمیر و نیز تولید برخی آنزیم‌ها می‌شوند (Liu et al., 2010)، و بدین طریق روند رشد را بهبود می‌بخشند. در گزارشات بسیاری اظهار شده است که اغلب پروبیوتیک‌ها اثراتشان را از طریق تشکیل کلنی در میزبان و ترشح ذرات مغذی بهبود دهنده ی رشد، اعمال می‌نمایند (Bagheri et al., 2008; Mohapatra et al., 2012).

در تحقیق حاضر، چگونگی بهبود عملکرد سیستم گوارشی به عنوان یکی از عوامل موثر بر عملکرد مطلوب رشد و تغذیه، از سه طریق مورد بررسی قرار گرفت. روش اول، اثرات پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر میزان فعالیت برخی از مهمترین آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز)، روش دوم اثر پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر فلور باکتریایی روده و روش سوم، اثرات پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر تغییر سطوح جذب و ساختار بافتی روده بچه ماهی کپور معمولی بوده است. بطوریکه در یک نگاه کلی نتایج تحقیق حاضر در رابطه با روش اول و آنزیم‌های گوارشی نشان داد که بیشترین میزان آنزیم‌های گوارشی پروتئاز، لیپاز و آمیلاز در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک‌ها و کمترین میزان این آنزیم‌های گوارشی در تیمار شاهد مشاهده شد. در رابطه با روش دوم نیز مشخص شد که تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده ماهیان در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک، به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود. در رابطه با روش سوم و تغییرات بافت روده، ساختار بافتی روده در تیمارهای مختلف آزمایشی با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت و در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک‌ها، افزایش در پرزهای (ویلی‌ها) لایه اپی تلوم و ارتفاع اپی تلوم پرزها، در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد و بیشترین میزان افزایش نیز در تیمارهای ۸ و ۵ بوده است.

با توجه به اینکه ثابت شده، فعالیت نسبتاً بالاتر آنزیم‌های گوارشی، بهبود عملکرد رشد را در پی دارد (Mohammadian et al., 2017)، مشاهده عملکرد بهتر رشد در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد، امری دور از ذهن نیست. اعتقاد

بر این است که بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی در زمان به کارگیری پروبیوتیک در جیره غذایی آبزیان در بسیاری از موارد وابسته به تجمع و افزایش جمعیت باکتریای مفید در دستگاه گوارش، فعالیت آنزیم‌های میکروبی، بهبود تعادل میکروبی روده، بهبود هضم و جذب غذا و اثر آنزیم‌های خارجی در گونه هدف است (Mohapatra et al., 2012; Askarian et al., 2008) که این ترشحات خارجی (Exogenous enzymes) از آنجا که در محدوده وسیع تری از pH فعال بوده و عمر فعالیت بیشتری نسبت به آنزیم‌های داخلی (Endogenous enzymes) دارند می‌توانند هضم پذیری دستگاه گوارش را به طور چشمگیری افزایش و متعاقباً در بهبود رشد اثر معناداری داشته باشند (نجفی انفرادی و همکاران، ۱۳۹۸). در واقع ازدیاد باکتری‌های مفید روده باعث می‌شود که فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در دستگاه گوارش افزایش یابد (Lee et al., 1990). این باکتری‌ها به دلیل ترشح آنزیم‌های خارج سلولی (نظیر آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) نقش بسیار مهمی در افزایش فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در روده ماهیان دارند. لذا این باکتری‌ها موجب افزایش قابلیت هضم پذیری پروتئین، چربی و کربوهیدرات‌ها شده و آنها را به واحدهای سازنده شان تبدیل می‌کنند و در نتیجه کارآیی تغذیه و رشد بهتری را در آبزیان موجب می‌گردند (Bairagi et al., 2002). لازم به ذکر است که پروتئاز، آمیلاز و لیپاز به ترتیب مهمترین آنزیم‌های مربوط به هضم پروتئین، کربوهیدرات و چربی هستند.

هر چند در تحقیق حاضر، میزان آنزیم‌های گوارشی متناسب با افزایش عملکرد رشد، در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به شاهد افزایش یافت اما

مشاهده نتایجی مغایر در رابطه با استفاده از پروبیوتیک ها در آبزیان مختلف به عواملی مانند نوع پروبیوتیک، میزان آن، مدت استفاده از آن، سن و اندازه میزبان که در تعیین اثر بخشی پروبیوتیک های مورد استفاده در ماهی تأثیر گذارند (Austin and Austin, 2007)، مرتبط است.

فلور میکروبی ماهیان شامل مجموعه ای از باکتری ها می باشد که نقش مهمی را در هضم غذا و کنترل بیماری ها بر عهده دارند و از این رو نقش مهم در سلامت و رشد موجودات آبی ایفا می کند (Vine et al., 2004) که در صورت مناسب و مفید بودن فلور باکتریایی روده، رشد و سلامت ماهی بهبود خواهد یافت. در تحقیق حاضر تعداد کل باکتری ها (رشد یافته روی محیط کشت TSA)، در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری با هم داشتند و بیشترین مقدار در تیمارهای ۲ و شاهد مشاهده شد. همچنین تفاوت معنی داری در تعداد باکتری های اسید لاکتیک در تیمارهای مختلف مشاهده شد بطوریکه کمترین تعداد در تیمار شاهد و بیشترین تعداد در تیمار ۸، مشاهده شد. عملکرد مناسب رشد در ماهیان دارای فلور میکروبی مطلوب ناشی از ازدیاد باکتری های مفید روده است که افزایش ترشح آنزیم های خارج سلولی نظیر آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در روده و نتیجتاً افزایش قابلیت هضم پذیری کربوهیدرات ها، پروتئین و چربی و بهبود عملکرد رشد را در ماهی در پی دارد (Bairagi et al., 2002). در تحقیق حاضر، استفاده از باکتری های پروبیوتیکی نظیر *W. cibaria* و *L. lactis* که جز باکتری های اسید لاکتیک به حساب می آیند، به عنوان فلور میکروبی مفید هستند که با توجه به نتایج حاصله در عملکرد رشد بچه ماهی کپور اثر مثبت داشته اند.

مشابه با نتایج تحقیق حاضر، استفاده از باکتری *L. lactis* در جیره غذایی تاس ماهی ایرانی (شناور ماسوله و همکاران، ۱۳۹۵) و پروبیوتیک های اسید لاکتیکی *Lactococcus lactis*، *Lactobacillus sakei* و *Leuconostoc mesenteroides* در غذای ماهی تیلاپای نیل (Balcazar et al., 2007) سبب افزایش معنی دار تعداد باکتری های اسید لاکتیک در روده ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد گردید. لازم به ذکر است که مطالعاتی که به بررسی اثر لاکتوکوکوس ها بر ماهی کپور معمولی پرداخته اند، بسیار کم و محدود است و در مطالعه انجام شده توسط Feng و همکاران (۲۰۱۹)، هرچند بهبود عملکرد رشد و ایمنی مشاهده شد. اما به نقش لاکتوکوکوس مصرفی در تغییر تعادل میکروبی روده پرداخت و تأثیر آن را به صورت ناشناخته بیان نمود. اما در تحقیق حاضر مشخص شد که تعداد باکتری های اسید لاکتیک چه از جنس لاکتوکوکوس و چه از جنس ویسلا، در تیمارهای دریافت کننده این پروبیوتیک ها، به طور معنی داری افزایش یافت. با توجه به نتایج می توان اشاره نمود که کلونیزاسیون مناسب باکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده در تحقیق حاضر در روده ناشی از فراهم بودن شرایط تثبیت، کلونیزاسیون و رشد آن در روده بچه ماهی کپور معمولی بوده است.

در تحقیق حاضر، تأثیر مکمل های پروبیوتیکی بر تغییرات بافت روده مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهای همچون ارتفاع پرزهای روده ای، درصد لنفوسیت ها و سلول های جامی شکل، در بافت روده ماهیان تیمارهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. زیرا بافت شناسی، ابزاری اولیه برای ارزیابی تغییرات بافتی است و در مطالعات مختلف مربوط به آبزیان و ماهی ها

مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mohapatra et al., 2012). بررسی روند تغییرات دستگاه گوارش، خصوصاً روده و پرزهای آن دارای اهمیت خاصی است زیرا تغییرات بافت روده شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت فیزیولوژیک روده است، که می‌تواند بر روند هضم و جذب غذا و نهایتاً رشد ماهیان اثرگذار باشد. روده محل اصلی هضم غذا و جذب مواد است و در نتیجه استفاده بهینه از مواد مغذی جیره به عملکرد موثر این اندام بستگی دارد (Liu et al., 2009). افزایش قطر و ارتفاع پرزهای روده، افزایش سطح جذب در روده و نتیجتاً افزایش کارایی استفاده از جیره غذایی مصرفی را به دنبال دارد (سپهرفر و همکاران، ۱۳۹۷). از این رو تغییرات بافت شناسی این اندام می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد کیفیت جیره، سوخت و ساز بدن و وضعیت تغذیه‌ای ماهی ارائه نماید (Meng et al., 2012). نتایج بافت شناسی نشان داد که هر چند آسیبی به بافت روده هیچیک از تیمارها وارد نیامد، اما افزایش در ارتفاع پرزهای روده در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک‌ها، در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد و بیشترین میزان افزایش نیز در تیمارهای ۸ و ۵ بوده است. همچنین بزرگترین چین خوردگی در روده ماهیان تیمارهای ۸ و ۵ و کمترین چین خوردگی در روده ماهیان تیمار شاهد مشاهده شد. این نتیجه نشان داد که مصرف پروبیوتیک‌های مذکور هیچگونه اثر سویی بر بافت روده بچه ماهیان کپور معمولی ندارد. از طرفی ماهیانی که با غذای حاوی ترکیبی از پروبیوتیک‌های *L. lactis* و *W. cibaria* به میزان ۳۰۰ mg/kg تغذیه شده بودند، و نیز ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *W. cibaria* به میزان ۳۰۰ mg/kg نسبت به سایر تیمارها همانطور که شرایط رشد و تغذیه ی مطلوب-

تری داشتند، افزایش ارتفاع پرز روده و چین خوردگی بیشتری نیز داشتند.

چین‌های مخاط روده قابلیت جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهند و هرگاه اندازه چین های مخاطی افزایش یابد مواد غذایی نیز افزایش می‌یابد (بانان خجسته و همکاران، ۱۳۸۸). تأثیر بهبود ساختار بافتی روده به لحاظ ریخت شناسی در عملکرد دستگاه گوارش و متعاقباً افزایش رشد و ایمنی امری بدیهی است. در مطالعات مربوط به آبزیان، بلندی پرزهای روده و چین های مخاطی، شاخص هایی برای توانایی جذب به شمار می‌روند (Won et al., 2020). افزایش اندازه پرزها سبب افزایش سطح جذب روده ای و در نهایت جذب بهتر مواد مغذی شده و بهبود رشد آبزی را تضمین می‌نماید (Gisbert et al., 2014). بطوریکه پروبیوتیک‌ها یکی از مکمل‌هایی‌اند که جذب ذرات غذایی را از طریق تغییر در بافت روده همچون افزایش طول پرز روده و ضخامت لایه موکوسی، تسهیل می‌نمایند (Won et al., 2020). استفاده از مکمل پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* به میزان $10^9 \times 0.9$ CFU/g تأثیری در تغییر ارتفاع یا قطر پرزهای روده ای در بچه ماهیان کپور معمولی نداشت (سپهرفر و همکاران، ۱۳۹۷). دلیل این مغایرت با تحقیق حاضر را می‌توان به ناکافی بودن میزان مکمل استفاده شده در جیره غذایی ماهی مرتبط دانست. بطوریکه سپهرفر و همکاران (۱۳۹۷) نیز، به همین دلیل، اشاره نمودند و ثابت شده که میزان پروبیوتیک مصرفی از جمله عواملی است که در تعیین اثر بخشی پروبیوتیک تأثیر می‌گذارد (Austin and Austin, 2007).

در نتیجه می‌توان گفت مصرف باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus*

lactis خصوصاً به صورت ترکیبی و به میزان mg/kg ۳۰۰ و پس از آن استفاده از mg/kg ۳۰۰ پروبیوتیک *W. cibaria* سبب بهبود عملکرد رشد و تغذیه، افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی، بهبود فلور میکروبی روده و افزایش باکتری های اسید لاکتیک روده در بچه ماهی کپور معمولی می گردند.

سپاسگزاری

از کلیه همکارانی که در انجام این تحقیق نهایت همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- آذری تاکامی، ق.، حقیقی، ع.، بهمنش، ش.، بهروز خوش قلب، م. ر.، مدبری، ع.، نوروزی، م.، ۱۳۹۱. بررسی افزایش باکتری به جیره قلز آلا و اثرات آن بر فاکتورهای رشد ایمنی و مقاومت در مقابل استرس های محیطی، بخش سوم. شرکت دارویی پاک گستر پرند ۲۴. صفحه.
- اینالو، ک.، علی نژاد، س.، زحمتکش، ع. و امینیان فتیده، ب.، ۱۳۹۸. مقایسه اثر جیره های حاوی پروبیوتیک های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* بر شاخص های رشد، خون شناسی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۸ (۳)، ۱۸۵-۱۹۵.
- بانان خجسته، س. م.، ابراهیمی، س.، رضانی، م. و حق نیا، ح.، ۱۳۸۸. مطالعه هیستولوژی، هیستوشیمیایی مری و روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی جانوری، ۱ (۴)، ۱۷-۲۶.
- برغمان، ح.، یگانه، س. و کرامت امیرکلایی، ع.، ۱۳۹۸. استفاده از پروبیوتیک *Lactis subsp. lactis*

- Lactococcus* و کیتین در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر عملکرد رشد، ترکیب لاشه و هضم پذیری جیره. مجله تغذیه آبزیان. ۱۵ (۱)، ۱۳۱-۱۴۵.
- حسینی، ع.، اورجی، ح.، یگانه، س. و شهابی، ح.، ۱۳۹۳. تأثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی روی رشد، فاکتورهای خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. ۲۳ (۲)، ۳۵-۴۵.
 - حسینی، ع.، چهارلنگ، ف.، ستوده، الف.، علیشاهی، م. و مدرسی، م.، ۱۳۹۵. اثر لاکتوباسیلوس های جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*) بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور میکروبی روده ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۵ (۲)، ۱۶۷-۱۸۰.
 - ذریه زهرا، م. ج.، قیاسی، م. و بینایی، م.، ۱۳۹۲. بررسی برخی شاخص های خونی و سرمی ماهیان کفال طلایی (*Liza auratus*) آب های جنوب دریای خزر استان مازندران در پی بروز نوعی بیماری نوپدید. نشریه توسعه آبی پروری، ۷ (۴)، ۲۵-۳۳.
 - رضایی تبار، س.، اسماعیلی ساری، ع.، بهرامی فر، ن. و رمضانپور، ز.، ۱۳۹۶. ارزیابی کیفیت آب استخرهای پرورش ماهی در شمال ایران (مطالعه موردی: شهر رشت). فصلنامه علوم تکثیر و آبی پروری، ۴ (۳)، ۲۳-۴۴.
 - سپهرفر، د.، سروی مغاللو، ک.، حسینی فر، ح.، پاک نژاد، ح. و جعفرنوده، ع.، ۱۳۹۷. تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* بر شاخص های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۱۱ (۲)، ۲۷-۳۶.

۱۰. شریف پور، ع و حلاجیان، ع.، ۱۳۹۴. روش‌های آزمایشگاهی بافت شناسی آبزیان. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۳۵۶ صفحه.
۱۱. شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۱. شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک روده بچه تاسماهیان ایرانی *Acipenser persicus* و کارآیی آنها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنو فیزیولوژی. رساله دکتری. دانشکده دامپزشکی گروه بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران. ۱۴۰ صفحه.
۱۲. شناور ماسوله، ع.، سلطانی، م.، احمدی، م.، پورکاشمی، م. و طاهری میرقائد، ع.، ۱۳۹۵. تأثیر تغذیه ای لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis* JF831150) بر وضعیت فلور باکتریایی روده تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و مواجه سازی با آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*). مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷(۳)، ۳۰۳-۳۱۰.
۱۳. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م. و زرگر، ۱۳۹۱. اثرات تحریک ایمنی و رشد لوامیزول، ارگوسان و سه عصاره گیاهی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات کشاورزی. ۶۷(۳)، ۱۳۵-۱۴۲.
۱۴. قبادی، ش.، توکلی، ح. و امیری مجازی، ب.، ۱۳۹۳. اثر سطوح مختلف پروبیوتیک باکتوسل بر برخی شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیبات بدن بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبرزی پروری. ۸(۴)، ۷۷-۸۷.
۱۵. لشتو آقایی، غ.ر.، خارا، ح. و صیاد بورانی، م. ۱۳۹۹. تأثیر پروبیوتیک باکتوسل و آهن بر رشد ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). نشریه علمی توسعه آبرزی پروری، ۱۴(۳)، ۱۰۱-۱۱۲.
۱۶. محمودی کیا، ز. و ایمانی، ا.، ۱۳۹۷. شیوه‌های مختلف تقویت سیستم ایمنی آبزیان. فصلنامه علوم آبرزی پروری پیشرفته. ۲(۲)، ۲۹-۴۱.
۱۷. نجفی انفرادی، م.، محمدی زاده، ف.، سلطانی، م.، بحری، ا. و شیخ زاده، ن.، ۱۳۹۸. بررسی اثر لاکتوباسیلوس پلانتروم و مانان الیگوساکارید بر رشد و برخی فاکتورهای گوارشی ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۱۳(۱)، ۶۹-۸۳.
۱۸. هاشمی مفرد، م.، ستاری، م.، خوش خلق، م.ر.، شناور ماسوله، ع. و عباسعلی زاده، ع.، ۱۳۹۵. مطالعه تأثیر باکتری ویسلا سیریا (*Weissella cibaria*) بر فاکتورهای رشد در تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۵(۲)، ۱۷-۲۸.
19. Adel, M., El-sayed, A., Yeganeh, S. and Dadar, M., 2016. Effect of Potential Probiotic *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* on Growth Performance, Intestinal Microbiota, Digestive Enzyme Activities, and Disease Resistance of *Litopenaeus vannamei*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 9 (2), 150-156.
20. Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J., Panagou, E.Z., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiol, 33, 282-291.
21. Askarian F., Matiar A., Kousha A., Bahmani M., Khorshidi K., Shenavar A., Ringo E., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tracts of reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*): A Comparative Study. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 3(5), 302-311.
22. Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish (4th edn). Springer Praxis, Chichester, UK.
23. Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, A., 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow

31. Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K.B., Badiola, I., 2014. *Bacillus cereus* var: toyol promotes growth, affects the histological organization and microbiota of intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91, 2766-2774.
32. Lee, S.Y. & Lee, B.H., 1990. Esterlytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subcasei L129. *Food science*, 55, 1-19.
33. Liu, H., Wu, X., Zhao, W., Xue, M., Guo, L., Zheng, Y., 2009. Nutrients apparent digestibility coefficients of selected protein sources for juvenile Siberian (*Acipenser baerii* Brandt), compared by two chromic oxide analyses methods. *Aquaculture Nutrition*, 15(18), 25- 34.
34. Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W. Liu, C., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 837-844.
35. Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J. Hervi., Metailler, M.R. and Ollevier. F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*, 14(3), 219-229.
36. Mazurkiewicz, J., Przybyl, A. & Golski, j., 2008. Evaluation selected feeds differing in dietary lipids levels in feeding juveniles of wells catfish (*Silurus glanis*). *ALEP*, 38, 91-96.
37. Meng, Q., Shaoxiong, D., Xiaojing, X., Minghui, S., Yingzhe, Y., Yongquan, S., 2012. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture*, 334, 132-141.
38. Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B., Davies, S.J., 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 17, 73-79.
39. Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M. & Gharibi, D., trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquaculture Science*, 8, 43-48.
24. Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture*, 10, 109-121.
25. Balcazar, J.L. and Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in Juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55, 409-412.
26. Beck, B.R., Kim, D., Jeon, J., Lee, S.M., Kim, H.K., Kim, O.J., Lee, J.I., Suh, B.S., Do, H.k., Lee, K.H., Holzapfel, W.H., Hwang, J.Y., Kwon, M.G., Song, S.K., 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 42, 177-183.
27. Bernfeld, P., 1955. Amylase alpha and beta. In: Colowick S P, Kaplan N O, eds. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 149-158.
28. Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129(1), 95-112.
29. Farzanfar, A., Lashto Aghaei, G., Alizadeh, M., Bayati, M., Ghorban, R., 2007. Study on growth performance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae with different concentration of probiotic in diet. In: *Proceedings of Aquaculture*, San Antonio, Texas, USA.
30. Feng, J., Chang, X., Zhang, Y., Yan, X., Zhang, J. & Nie, G., 2019. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 93, 73-81.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.

- hydrolytic enzyme activities of native Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41, 43-51.
47. Shihabi, Z. K. & Bishop, C., 1971. Simplified turbid metric assay for lipase activity. *Clin Chem*, 17(12), 1150-1153.
 48. Torfi Moazenzadeh, M., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N., Marammazi, J.G. and Popovic, N.T., 2015. Reference intervals for haematological and plasma biochemical parameters in sobaity sea bream juveniles (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). *Comparative Clinical Pathology*, 24, 1501-1507.
 49. Vine, N., Leukes, W., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T., 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish diseases*, 27, 319-326.
 50. Xuxia, Zh., Yanob, W., Jiangtao, Y. and Li, W., 2010. Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immune stimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2, 73-80.
 51. Yazici, I.S., Hisar, O., Yilmaz, S., Yigit, M., 2015. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub lethal water temperature. *Marine Science and Technology Bulletin*, 4, 21-28.
 52. Won. S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W.J., Kong, I. and Bai, S., 2020. Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8 (67), 1-15.
 2017. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on growth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971). *Iranian Journal of Fisheries Science*, 16 (1), 296-317.
 40. Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M.R. & Mesbah, M., 2019. Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 634197.
 41. Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G. and Mohanata, K.N., 2012. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97 (3), 405-430.
 42. Mourino, J.L.P., Pereira, G.V., Viera, F.N., Jatoba, A.B., Ushizima, T.T., Silva, B.C., Seiffert, W.Q., Jesus, G.F.A. & Martins, M.L., 2016. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* $\times$ *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach. *Aquaculture Reports*, 3, 166-171.
 43. Nguyen, T.L., Park, C. I., Kim, D.H., 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, 471, 113-120.
 44. Olsen, R.E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M., Ringø, E., 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research*, 32, 931-934.
 45. Ringo, E. and F.J. Gatesoup., 1998. Lactic acid bacteria in fish: A Review. *Aquaculture*, 160, 177-203.
 46. Ross, N., Firth, K., Wang, A., Burka, J., and Johnson, S., 2000. Changes in