

"مقاله پژوهشی"

اثرات پروبیوتیک اختصاصی بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی

سیدماهان موسویان پاداشتی گیلانی^۱، سهیل بازاری مقدم^{۲*}، نعمت اله محمودی^۱، جلیل جلیل پور^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران،

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۵

چکیده

این پژوهش با هدف تعیین اثربخشی کاربرد پروبیوتیک‌های اختصاصی، جداسازی‌شده از ازون‌برون پرورشی شامل (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*) با نسبت‌های برابر بر شاخص‌های رشد و ایمنی این گونه انجام پذیرفت. بدین منظور، ۱۴۴ عدد ازون‌برون پرورشی با میانگین وزنی $64/94 \pm 0/22$ گرم، با مقادیر ۰ (تیمار ۱)، ۱۵۰ (تیمار ۲)، ۳۰۰ (تیمار ۳) و ۴۵۰ (تیمار ۴) میلی گرم پروبیوتیک اختصاصی در هر کیلو گرم غذا به مدت هشت هفته در ۱۲ مخزن فایبرگلاس نیم تنی با حجم آبگیری ۳۰۰ لیتر (هر تیمار با سه تکرار) تغذیه شدند. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب نیز به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت گردیدند. نتایج این پژوهش نشان داد با افزودن پروبیوتیک اختصاصی در غلظت‌های مختلف به جیره غذایی، اختلاف معنی‌داری در افزایش وزن نهایی، رشد ویژه، ضریب چاقی مشاهده نگردید ($p > 0/05$). اما تیمار ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک در کیلو گرم غذا عملکرد بهتری را نشان داد. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزودن پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری در ضریب تبدیل غذایی تیمار ۳ مشاهده شد ($p < 0/05$). بیشترین مقادیر لیزوزیم و ACH_{50} بصورت معنی‌داری در تیمار ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک در کیلو گرم غذا نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید ($p < 0/05$). با توجه به این نتایج می‌توان بیان داشت که بکارگیری پروبیوتیک اختصاصی ازون‌برون پرورشی در جیره غذایی مورد استفاده این ماهی، می‌تواند در بهبود شاخص‌های رشد و پیشگیری از بیماری‌های احتمالی از طریق افزایش شاخص‌های ایمنی مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: ماهیان خاویاری، باکتری‌های اسید لاکتیک، شاخص‌های رشد، ایمنی.

مقدمه

پرورش آبزیان امروزه به عنوان یکی از زمینه‌های اصلی تولید در بخش کشاورزی و تامین غذا برای انسان، به یکی از مهمترین صنایع تبدیل شده است. پرورش گونه‌های متعدد آب شیرین و دریایی در گروه‌های مختلف ماهی، میگو، نرم‌تنان، دو کفه‌ای-ها و گیاهان دریایی نقش مهمی در تامین غذا برای بسیاری از افراد دارد (Alagawany et al., 2021). در این بین پرورش دهندگان در مراکز پرورشی و تحقیقاتی همواره به دنبال افزایش کارایی تولید برای تولید بیشتر و با صرفه اقتصادی بیشتر بودند. به همین دلیل روش‌های متعددی برای افزایش راندمان تولید و کاهش مشکلات و بیماری‌ها استفاده شد. با توجه به اینکه غذا و تغذیه در بحث پرورش آبزیان پرورشی موضوع اصلی و اساسی است و تقریباً نیمی از هزینه‌های تولید مربوط به تهیه و عمل‌آوری غذا می‌باشد، لذا توجه به داشتن یک برنامه غذایی کارآمد و با صرفه اقتصادی همواره دغدغه اصلی تولیدکننده‌ها بوده است (Assefi et al., 2021). در این بین استفاده از مکمل‌های غذایی و دارویی و غذاهای فرموله شده اختصاصی در بسیاری از واحدهای تولیدی غذای آبزیان استفاده شده است. از جمله این مکمل‌های غذایی ترکیباتی موسوم به پروبیوتیک‌ها هستند که نقش مهمی را در افزایش کارایی مواد غذایی در دستگاه گوارش آبزیان ایفا می‌کنند. از نظر زیست‌شناسی پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از موجودات ریز ذره‌بینی هستند که در گروه‌های باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها دسته‌بندی می‌شوند. این موجودات سودمند بوده و هیچ‌گونه بیماری‌زایی برای بدن جانوران ندارد، بلکه با افزایش راندمان جذب آب و املاح و مواد غذایی و

هضم بهتر آن‌ها موجب بهبود شاخص‌های رشد، ایمنی‌زایی، زادآوری و تولید گوشت می‌گردند (Banuelos-Vargas et al., 2021).

تحقیقات مختلفی روی اثرگذاری پروبیوتیک‌ها بر رشد و شاخص‌های مختلف خونی و بیوشیمیایی ماهیان مختلف انجام شده است. از جمله بازاری مقدم و همکاران (۱۴۰۰) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک اختصاصی در سطوح ۳۰۰ میلی گرم موجب بهبود رشد و ایمنی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) جوان پرورشی گردید. در تحقیق یگانه و همکاران (۱۴۰۰) که اثر پروبیوتیک بومی بر شاخص‌های رشد، خون و ایمنی بچه فیل ماهی پرورشی را مورد بررسی قرار دادند، مشخص گردید که غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره می‌تواند در پرورش مرحله انگشت قد این گونه سودمند باشد. در مطالعه‌ای قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹)، تأثیر دو سویه باکتری پروبیوتیکی را بر فلور روده، فاکتورهای بیوشیمیایی، شاخص‌های ایمنی و رشد فیل-ماهی جوان پرورشی انجام دادند که نتایج بدست آمده حاکی از بهبود مقادیر شاخص‌های ایمنی و رشد در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با سایر تیمارها بود. لازم به ذکر است که در این راستا می‌توان به مطالعات هاشمی مفرد و همکاران (۱۳۹۵) و شکوریان و همکاران (۱۳۹۹) نیز در ماهیان خاویاری اشاره نمود. در حال حاضر، فرآورده‌های پروبیوتیکی تجاری در قالب باکتری‌های غیر اختصاصی، مورد استفاده آبی‌پروران قرار می‌گیرد. در حالی که مصرف پروبیوتیک‌های اختصاصی به ویژه گونه‌های ماهیان خاویاری، می‌تواند در راستای صنعت آبی‌پروری و تولید بیشتر ماهیان خاویاری مفید واقع

شود. از این سو، تحقیق حاضر با هدف استفاده از پروبیوتیک اختصاصی ازون‌برون پرورشی و تعیین اثر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی این ماهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری انجام پذیرفت. در این تحقیق ۱۴۴ عدد ماهی ازون‌برون پرورشی (*Acipenser stellatus*) با میانگین وزنی $64/94 \pm 0/22$ گرم در ۱۲ مخزن فایبرگلاس نیم تنی (هر مخزن ۱۲ عدد ماهی)، با حجم آبگیری ۳۰۰ لیتر (هر تیمار با سه تکرار) بدون دارا بودن اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های طول و وزن به طور کاملاً تصادفی توزیع شدند. آب مورد نیاز سیستم پرورش از رودخانه سپیدرود تأمین و پس از انتقال به حوضچه‌های رسوب‌گیر، جهت متعادل نگه داشتن دما جهت تغذیه بهتر ماهیان (Shi et al., 2008) مخلوطی از آب چاه و رودخانه با دبی ۳ لیتر در دقیقه به وسیله دستگاه پمپاژ به مخازن فایبرگلاس انتقال یافت.

جهت غنی‌سازی جیره‌های غذایی، چهار تیمار (هر تیمار با سه تکرار) حاوی پروبیوتیک اختصاصی ازون‌برون پرورشی که شامل باکتری‌های (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*) که با نسبت‌های برابر از هر نوع و به صورت پودر تهیه شده بود، با مقادیر صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک به ازای یک کیلوگرم غذای کنسانتره و برای میزان اثر بخشی به مدت ۸ هفته توسط ماهیان مورد تغذیه قرار گرفتند (Bazari Moghaddam and Pourjaafari, 2021).

با توجه به این که نحوه اضافه نمودن پروبیوتیک در غذا و همچنین حفظ کیفیت غذای مصرفی دارای

اهمیت است، بدین منظور جهت مقادیر مورد نظر باکتری (۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک) به طور جداگانه در ظروف پلاستیکی استریل توزین شده و سپس ۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به آن اضافه گردید (هاشمی مفرد و همکاران، ۱۳۹۵). سپس در مرحله بعد، هر محلول آماده شده به غذای مربوطه اسپری و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طی دوره پرورش ۸ هفته، ماهیان با استفاده از غذاهای آماده‌شده حاوی پروبیوتیک و غذای فاقد پروبیوتیک (غذای معمولی) به میزان ۳ درصد وزن بدن و ۳ مرتبه در روز مورد تغذیه قرار گرفتند (محسنی و همکاران، ۱۳۸۴). ویژگی‌های آب و شرایط محیطی شامل درجه حرارت آب و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه اکسیژن متر و pH با استفاده از pH متر مدل Eutech اندازه‌گیری شد.

پس از پایان دوره پرورش، به منظور کاهش استرس واردشده به ماهیان، غذادهی ۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی قطع شد (Mohseni et al., 2008). سپس برای تعیین اثر باکتری‌های اسید لاکتیک بر شاخص‌های رشد ازون‌برون پرورشی، شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب چاقی ارزیابی شد. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر، تاثیر پروبیوتیک اختصاصی بر رشد ازون‌برون پرورشی محاسبه گردید.

$$FCR = F/WG$$

(افزایش وزن = WG؛ غذای داده شده = F)

(Hevroy et al., 2005)

$$SGR = (L_n W_2 - L_n W_1) \times 100 / \text{days}$$

(مدت پرورش = days؛ لگاریتم نپرین = L_n)

(Hevroy et al., 2005)

$$CF = (W/L^3) \times 100$$

(طول کل (سانتی‌متر) = L؛ وزن (گرم) = W)

(Austreng, 1978)

شد. لیزوزیم سفیده تخم مرغ لیوفلیزه شده (Sigma) نیز به عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب (mg/ml) محاسبه گردید (Merrifield et al., 2009).

فعالیت آلترناتیو کمپلمان (ACH_{50}) بر اساس روش نورسنجی یا photometric سنجیده شد و بوسیله همولیز سلول‌های قرمز خون خرگوش (RaRBC; TCS) (Biociences. Botolph claydon, UK) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در این روش RaRBC پس از سه بار شسته شدن در ۰/۰۱ مول بافر اتیلن گلیکول تراستیک - اسید - منیزیم ژلاتین و رونال بافر (0.01 M MGTA-Mg-GVB, Ph7) تعداد سلول‌ها نیز در همان بافر روی 2×10^8 سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. در ابتدا با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر RaRBC خط بالا در ۳/۴ میلی لیتر آب مقطر، میزان ۱۰۰ درصد انحلال بدست آمد و پس از آن عمل سانتیفریوژ انجام می‌شود و سپس غلظت دیداری (O.D) محلول بالای رسوب در طول موج ۴۱۴nm توسط اسپکتروفتومتر (Awareness, USA) مدل Statfax-2100 تعیین گردید.

در مرحله بعد، سرم‌ها ۱۰۰ مرتبه رقیق شده و در محدوده ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر (حجم کل بافر تا ۲۵۰ میکرولیتر تنظیم شده) با استفاده از ۱۰۰MI از RaRBC در لوله‌های تست کوچک، از ایجاد واکنش ممانعت گردید. این مخلوط در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در جهات مختلف بهم زده شده و سپس انکوبه گردید. در ادامه ۳/۱۵ میلی لیتر محلول کلراید سدیم ۰/۸۵ درصد اضافه شد و لوله‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۰۰ دور سانتیفریوژ شدند. سپس O.D محلول بالای رسوب، محاسبه شد. در منحنی تحلیل (Lysis)، نمودار درصد همولیز در مقابل حجم سرم بر حسب log نشان داده شد.

$$BWI = (W2 - W1) \times 100 / W2$$

(g) (وزن نهایی = W2; وزن ابتدایی = W1)

(Piedecausa et al., 2007)

ضمناً به صورت کاملاً تصادفی (از هر مخزن ۳ عدد ماهی)، با استفاده از سرنگ ۲ سی سی از سیاهرگ دمی (باله مخرجی) نمونه خون برداشت گردید. ۱/۵ سی سی خون به تیوپ‌های اپندورف غیر هپارینه برای انجام مطالعات عوامل ایمنی ریخته شد.

نمونه‌های خون برای انجام ارزیابی و بررسی عوامل ایمنی به آزمایشگاه ویرومد واقع در شهرستان رشت منتقل شد. سپس شاخص‌های لیزوزیم، ایمنوگلوبین و فعالیت آلترناتیو کمپلمان مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای انجام مطالعات ایمنی، نمونه‌های خون موجود در لوله‌های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین با چرخش ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. در مرحله بعد، سرم جدا و با استفاده از سمپلر به تیوپ‌های اپندورف انتقال و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای سنجش میزان لیزوزیم سرمی از روش توصیه شده، Sahoo و همکاران (۲۰۰۸)، استفاده شد. با استفاده از دستگاه Elisa reader (Awareness, USA)

مدل Statfax-2100 و به روش Turbidimetric (کدورت سنجی) از طریق تحلیل تدریجی باکتری‌های گرم مثبت (*Micrococcus* (sigma, USA) *lysodeikticus* بدست آمد. بطور خلاصه ۵۰ میکرولیتر سرم به ۹۵۰ میکرولیتر محلول باکتری *M. lysodeikticus* با غلظت (1-mg/ml) ۲۰۰ در ۵٪ فسفات سدیم (Sigma) در pH=۶/۲ اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، کاهش کدورت در طول موج ۵۳۰nm در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بعد از ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه مشاهده

۳۲۰ نانومتر با پلانک (آب مقطر) خوانده شد (سقا و سروش‌نیا، ۱۳۸۲؛ Khoshbavar- Rostami, et al., 2006).

به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در تیمارها از آزمون Kolmogorov- Smirnov و جهت مقایسه آماری داده‌های حاصل از شاخص‌های رشد و سیستم ایمنی تیمارهای مورد نظر، از آنالیز واریانس یک طرفه (Oneway Anova) و آزمون دانکن استفاده شد. کلیه آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ صورت گرفت.

به‌طوری‌که حجم بازده ۵۰ درصد همولیز برای تعیین فعالیت مکمل فرعی به شرح زیر به کار برده شد.

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین M روش ایمنوتوربیدی متری (Immunoturbidimetric) است. در این روش IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل VIS 2100 - ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج

جدول ۱: میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب تیمارها در دوره پرورش

شاخص‌ها	تیمار ۱ (جیره فاقد پروبیوتیک)	تیمار ۲ (۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۴ (۴۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)
دما (درجه سانتی‌گراد)	۱۴/۴۷ ± ۰/۵۰	۱۴/۴۸ ± ۰/۴۰	۱۴/۵۴ ± ۰/۳۹	۱۴/۴۳ ± ۰/۳۴
اکسیژن (میلی گرم/لیتر)	۱۰/۰۷ ± ۰/۱۸	۹/۹۷ ± ۰/۱۸	۹/۹۶ ± ۰/۱۶	۱۰/۰۰ ± ۰/۱۵
pH	۷/۵۹ ± ۰/۰۴	۷/۶۰ ± ۰/۰۷	۷/۶۲ ± ۰/۰۶	۷/۵۹ ± ۰/۰۹

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی، درصد افزایش وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی در تیمار ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد افزایش یافت ($p > 0.05$). در این تحقیق مقادیر ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳ بطور معنی داری نسبت به سایر تیمارهای حاوی پروبیوتیک و نیز گروه شاهد کاهش داشته است ($p < 0.05$).

جدول ۲: ترکیب جیره غذایی مورد استفاده در دوره پرورش

اجزای جیره	مقادیر اندازه‌گیری شده در جیره پایه (درصد)
پروتئین (درصد)	۴۷
چربی خام (درصد)	۱۴
سلولز (درصد)	۳/۸
خاکستر (درصد)	۸/۷
فسفر (درصد)	۱/۲

جدول ۳: نتایج شاخص های رشد ازون برون پرورشی در پایان دوره پرورش

شاخص ها	تیمار ۱ (جیره فاقد پروبیوتیک)	تیمار ۲ (۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۴ (۴۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	$1/72 \pm 0/04^a$	$1/68 \pm 0/06^a$	$1/53 \pm 0/05^b$	$1/66 \pm 0/07^a$
ضریب رشد ویژه (SGR)	$1/34 \pm 0/02^a$	$1/38 \pm 0/03^a$	$1/41 \pm 0/04^a$	$1/38 \pm 0/04^a$
درصد افزایش وزن (BWI)	$124/07 \pm 2/72^a$	$129/70 \pm 5/05^a$	$139/06 \pm 5/20^a$	$130/11 \pm 5/47^a$
ضریب چاقی (CF)	$0/23 \pm 0/004^a$	$0/24 \pm 0/006^a$	$0/25 \pm 0/006^a$	$0/24 \pm 0/02^a$

حروف غیر همنام کوچک نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد ($p < 0.05$).

در این تحقیق، افزودن پروبیوتیک به جیره موجب افزایش ترشح لیزوزیم، IgM و ACH₅₀ در ماهیان تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک شده و تمامی این تیمارها نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی دار

آماري بودند ($p < 0.05$). به طوریکه بیشترین مقدار لیزوزیم و ACH₅₀ در تیمار ۳ و بیشترین مقدار IgM در تیمار ۴ مشاهده گردید.

جدول ۴: نتایج اندازه گیری شاخص های ایمنی خون ازون برون در خاتمه دوره پرورش

شاخص ها	تیمار ۱ (جیره فاقد پروبیوتیک)	تیمار ۲ (۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک)	تیمار ۴ (۴۵۰ میلی گرم پروبیوتیک)
Lysozyme (واحد در میلی لیتر)	$26/67 \pm 1/20^c$	$31/67 \pm 1/45^b$	$37/33 \pm 1/20^a$	$36/33 \pm 1/20^a$
IgM (میلی گرم در دسی لیتر)	$34 \pm 0/58^c$	$45/67 \pm 1/20^a$	$40/67 \pm 1/20^b$	$46 \pm 0/58^a$
ACH ₅₀ (واحد در میلی لیتر)	$130/33 \pm 0/88^c$	$135 \pm 1/15^b$	$139/67 \pm 0/66^a$	$138/67 \pm 0/88^a$

حروف غیر همنام کوچک نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد ($p < 0.05$).

بحث

عمل، موجودات میکروسکوپی، ترکیبات فعال زیستی همانند آنزیم ها، ویتامین ها و اسیدهای آمینه را تولید می نمایند (Moriarty et al., 1990; Bairagi et al., 2002). در این خصوص محققان بر این عقیده اند که ماهیان تمایل به تغذیه از غذای غنی شده با پروبیوتیک ها را دارند که این عمل منجر به افزایش

اکثر مطالعات در خصوص استفاده از پروبیوتیک ها در آبی پروری حاکی از اثرات مفید و به نوعی توانایی پروبیوتیک ها در افزایش رشد می باشد (Lara-Flores et al., 2003). باکتری های موجود در دستگاه گوارش، بخشی از مواد غذایی را تجزیه می کنند که در اثر این

رشد و سلامت ماهیان خواهد گردید (Ferguson et al., 2010).

با توجه به موارد گوناگون اثبات‌شده، مبنی بر اینکه پروبیوتیک‌ها کمک مؤثری به هضم و جذب غذا نموده و سبب افزایش برخی از شاخص‌های رشد می‌شوند؛ با این وجود، در این راستا نتایج کاملاً متفاوتی از مطالعات بر روی اثرات پروبیوتیک نیز آبریان بدست آمده است که می‌توان دلیل تضاد در نتایج را تفاوت در نوع پروبیوتیک‌ها، گونه میزبان و شرایط محیطی دانست (Ferguson et al., 2010).

در تحقیق حاضر مشخص شد که هرچند افزودن پروبیوتیک اختصاصی برگرفته از روده ازون‌برون پرورشی نتوانست پس از ۸ هفته به طور معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و وزن نهایی بچه ازون‌برون پرورشی تأثیر بگذارد، اما این شاخص‌ها در تیمارهای با جیره غذایی حاوی پروبیوتیک اختصاصی به خصوص تیمار ۳ (3×10^7 باکتری در گرم) به مراتب بهبود یافته‌تر و برتر از سایر تیمارها و شاهد بود. نتایج مطالعات یگانه و همکاران (۱۴۰۰)، Bazari Moghaddam و همکاران (۲۰۲۱) و Pourgholam و همکاران (۲۰۱۷) به ترتیب روی بچه فیل ماهی، بچه تاسماهی ایرانی و تاسماهی سیری و همچنین Kazemi و همکاران (۲۰۲۰)، روی بچه تاسماهی ایرانی پرورشی، موید نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. کیفیت غذا و آب، میزان سلامت ماهی، تعادل در جیره غذایی، ترکیبات مغذی و گونه ماهی از جمله عوامل تأثیرگذار اساسی در این راستا می‌باشند. از آنجایی که، باکتری‌های پروبیوتیک تحریک‌کننده اشتها می‌باشند، سبب بهبود تغذیه به دلیل شکستن ترکیبات غیرقابل هضم و تولید ویتامین‌ها (Abdelhamid et al., 2004) می‌شوند، که در نهایت

بر شاخص‌های رشد نیز تأثیر مثبت می‌گذارند. به دنبال افزایش رشد ماهی، ترشح آنزیم‌ها زیاد شده، که این امر قابلیت هضم مواد غذایی را افزایش می‌دهد (Ringo and Gatesoup, 1998) به‌طوری‌که کاهش ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳ (300 میلی گرم پروبیوتیک در جیره) را توجیه می‌نماید.

بر اساس نظرات Fuller و همکاران (۱۹۸۷)، یکی از عملکردهای پروبیوتیک، تحریک سیستم ایمنی می‌باشد. در تحقیق حاضر برای نشان دادن اثر پروبیوتیک بر ایمنی ماهی، به بررسی عوامل ایمنوگلوبین M، لیزوزیم و آلترناتیو کمپلمان پرداخته شد.

لیزوزیم یک آنزیم کاتیونی می‌باشد که توانایی تجزیه باکتری‌های گرم مثبت را داشته، همچنین در اتصال به برخی از باکتری‌های گرم منفی نیز دارای اهمیت می‌باشد. کمپلمان، از اصلی‌ترین اجزای پاسخ ایمنی همورال است که در زمان بروز خطر در سیستم ایمنی دارای نقش بسزایی می‌باشد. ایمنوگلوبین M، یکی از اصلی‌ترین ایمنوگلوبین‌های موجود در ماهیان است و جز اصلی سیستم ایمنی همورال محسوب می‌شود (Sun et al., 2010).

نتایج این تحقیق نشان داد که پروبیوتیک اختصاصی باعث تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت لیزوزیم، آلترناتیو کمپلمان و ایمنوگلوبین M نسبت به گروه شاهد شده است. از آنجایی که، گلبول‌های سفید تولیدکننده لیزوزیم می‌باشند، با افزایش تعداد گلبول‌های سفید در اثر استفاده از باکتری‌های اختصاصی ازون‌برون پرورشی، میزان لیزوزیم نیز افزایش یافت. براساس نتایج این تحقیق، میزان فعالیت لیزوزیم سرم خون ازون‌برون پرورشی تغذیه شده با پروبیوتیک اختصاصی به

خصوص در تیمار ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک در جیره) اختلاف معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت. نتایج قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹) روی فیل ماهی جوان با اختلاف معنی دار، نیز با نتایج مطالعه حاضر همسو می باشد. اما نتایج تحقیق علیزاده نودری و همکاران (۱۳۹۶)، روی فیل ماهی جوان با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد. دلیل این اختلاف در نتایج را می توان به سن، گونه و همچنین باکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده در آزمایش مرتبط دانست.

این نتایج نشان داد که، بیشترین مقدار IgM با اختلاف معنی دار در تیمار ۴ (۴۵۰ میلی گرم پروبیوتیک در جیره)، نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد بود. این نتایج با نتایج مطالعات Bazari Moghaddam و همکاران (۲۰۲۱)، قربانی واقعی و همکاران (۱۳۹۹)، که به ترتیب روی بچه تاسماهی ایرانی و فیل ماهی جوان انجام شده، هم سو بود. دلیل افزایش مقدار IgM نسبت به گروه شاهد را می توان وجود باکتری های اسید لاکتیکی دانست که تولید پادتن می کنند (Malin et al., 1996).

نتایج حاصل از آزمون دانکن نیز مشخص نمود که میزان ACH₅₀ سرم خون ماهیان در تیمارهای ۳ (۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک در جیره) و ۴ (۴۵۰ میلی گرم پروبیوتیک در جیره) به شکل معنی داری بیشتر از تیمار ۲ (۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک در جیره) و شاهد بوده است. کمپلمان نقش مهم و حیاتی در افزایش میزان ایمنی در بدن ماهیان پرورشی دارد. در این خصوص بهروز خوش قلب و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* موجب افزایش معنی دار سطح کمپلمان ACH₅₀ در تیمارهای تغذیه شده ماهی قزل آلا ی رنگین کمان

گردید. کمپلمان نقش مهمی در کنترل شرایط پر استرس محیطی نظیر آلودگی ها، تراکم در واحد پرورش، بیماری ها و دستکاری ها در بدن ماهی های خاویاری دارد. نتایج نشان داد که پروبیوتیک های اختصاصی می توانند در جیره ماهی های خاویاری پرورشی موجب افزایش سطح میزان ACH₅₀ گردد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گیری نمود که به کارگیری پروبیوتیک اختصاصی ازون برون پرورشی در غذای مورد استفاده این ماهی، می تواند در بهبود شاخص های رشد، ایمنی و در نتیجه پیشگیری از بیماری های احتمالی و بالطبع کاهش هزینه های تولید نقش موثری داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مساعدت کارشناسان محترم بخش های بهداشت و بیماری ها و آبی پروری انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، که در مراحل اجرایی این پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می گردد. این مقاله بخشی از نتایج پروژه با کد مصوب ۹۹۰۰۱-۹۶۰۳۱-۰۰۱-۱۲-۳۲-۱۲ در سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی می باشد.

منابع

۱. بازاری مقدم، س.، جلیل پور، ج.، شناورماسوله، ع. معصوم زاده، م.، پورصفر، م.، ۱۴۰۰. کاربرد پروبیوتیک اختصاصی در بهبود رشد و ایمنی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) جوان پرورشی. مجله ترویجی ماهیان خاویاری، ۴(۶)، ۳۱-۲۵.

۷. کاظمی، ر.، یارمحمدی، م.، شناور ماسوله، ع.، حلاجیان، ع.، تیزکار، ب.، یگانه راسته‌کناری، ی.، جلیل‌پور، ج.، علیزاده، م.، ۱۳۹۹. تأثیر جیره غذایی حاوی پروبیوتیک اختصاصی بر برخی از شاخص‌های رشد، ایمنی، آنزیم‌های کبدی و فلور باکتریایی روده بچه تاسماهی پرورشی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله تغذیه آبزیان، ۶(۱)، ۷۱-۸۳.

۸. محسنی، م.، پور کاظمی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، ارشد، ع.، ۱۳۸۴. تعیین مناسب‌ترین درصد غذایی در پرورش گوشتی بچه فیل ماهی (*huso huso*) پرورشی در حوضچه‌های فایر گلاس. مجله علمی شیلات ایران، ۱۴(۴)، ۱۶۵-۱۵۴.

۹. هاشمی مفرد، م.، ستاری، م.، خوش‌خلق، م.ر.، شناور ماسوله، ع. و عباسعلی‌زاده، ع.، ۱۳۹۵. مطالعه تأثیر باکتری ویسلا سیریا (*Weissella cibaria*) بر فاکتورهای رشد در تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۲)، ۲۷-۱۷.

۱۰. یگانه راسته‌کناری، ه.، کاظمی، ر.، شناور ماسوله، ع.ر.، سید حسنی، م.ح.، یوسفی جوردی، ا.، حسین پوز زلتی، ع.، قربانی، ر.، ۱۴۰۰. تأثیر پروبیوتیک بومی بر برخی از شاخص‌های رشد، خون، ایمنی بچه فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی. نشریه علمی توسعه آبزی پروری، ۱۵(۱)، ۱۲۵-۱۳۶.

11. Abdelhamid, A.M., Abdelkhalek, A.E., Mehrm, A.I., Khalil, F.F., 2004. An attempt to alleviate aflatoxicosis on Nile tilapia fish by dietary supplementations with chicken-hatchery by-products (egg shells) and shrimp processing wastes (shrimp shells) 2-On clinical, blood and histological parameters. Journal of Agricultural Science. 29, 6175-6196.

۲. بهروز خوش‌قلب، ب.، م.، آذری تاکامی، ق.، خارا، ح.، کاظمی، ر.، ۱۳۹۲. بررسی تأثیر سطوح مختلف *Pedicoccus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهای ایمنی خون بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۶(۳)، ۵۳-۶۶.

۳. سقا، ح.، ر. و.، سروش‌نیا، م.، ۱۳۸۲. کتاب جامع تجهیزات و فرآورده‌های آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر، ۲۶۸۷ صفحه.

۴. شکوریان، م.، علیپور، ع.، یزدانی ساداتی، م.، باقرزاده، ف.، حسین پوز زلتی، ع.، سید حسنی، م.ح.، ۱۳۹۹. اثر سطوح مختلف پروبیوتیک‌های تجاری بومی سوپر زیست بر شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه و بقای تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*) جوان. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۴(۴)، ۵۵-۶۷.

۵. علیزاده نوذری، م. و شاپوری، م.، ۱۳۹۶. بررسی تأثیر پروبیوتیک آلفامیون بر شاخص‌های رشد، پارامترهای بیوشیمیایی خون و ترکیب لاشه فیل ماهی پرورشی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۴)، ۱۵۹-۱۵۱.

۶. قربانی واقعی، ر.، شناور ماسوله، ع.، کاظمی، ر.، یگانه، ه.، جلیل‌پور، ج.، حسین‌پور، ع.، ۱۳۹۹. تأثیر دو سویه باکتری پروبیوتیکی

(*Lactococcus lactis*) و (*Weissella confusa*) بر فلور روده، فاکتورهای بیوشیمیایی، شاخص‌های ایمنی و رشد فیل ماهی (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله ترویجی ماهیان خاویاری، ۳(۵)، ۱۶-۲۱.

21. Kazemi, R., Yarmohammadi, M., Hallajian, A., Jalilpour, J., Esmaeili, F., 2020. Influence of the photoperiod and light intensity on growth performance, Melatonin and Insulin-like growth factors gene expression on *Acipenser persicus* during the embryonic stage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19, 1175- 1192.
22. Khoshbavar- Rostami, H. A., Soltani, M., Hassan, H. M. D., 2006. Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon *Aquaculture*, 256(1), 88-94.
23. Lara-flores, M., Olvera-Novoa, M. A., GuzmánMéndez, B. E., 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 Journal*, 216,193-201.
24. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus*, *GG*. *Annals of Nutrition and Metabolism Journal*, 40, 137-45.
25. Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R. T. M., Davies, S. J., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture nutrition Journal*, 10, 1365- 1378.
26. Mohseni, M., Ozorio R.O.A., Pourkazemi M., Bai, S.C., 2008. Effects of dietary L_ Carnitine supplements on growth and body in beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 646 - 649.
27. Moriarty, D. J. W., 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Lesel, R. (Ed.), *Microbiology of Poecilotherms*. Elsevier Amsterdam, New York, 217–223.
28. Piedecausa, M. A., Mazon, M. J., Garcia, B. G., Ortuno, J., Esteban, M. A., Mulero, V., 2021. Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. *Aquaculture Journal*, 84,232-241.
13. Assefi, M., Onsory, K., Iranbakhsh., A., 2021. Understanding the toxicity of nanotubes and nanoparticles in the environment : Are nanotubes and nanoparticles safe. *AJPTI*, 9(21), 5–10.
14. Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture Journal*, 13, 265-272.
15. Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K. and Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture Journal*, 10, 109–121.
16. Bazari Moghaddam, S., Pourjaafari, M., 2021. The effects of four types of specific probiotic on growth performance, liver enzymes and immune indices of juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(4), 1179-1191.
17. Bañuelos-Vargas, I., Rodríguez-Montes de Oca, G. A., Martínez-Montaña, E., 2021. Antioxidant and immune response of juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured at different densities in sea water with biofloc plus probiotics. *Aquaculture Journal*, 12, 148–161.
18. Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa1, S., Picchiatti, S., Balcazar, J. L., Davies, S. J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
19. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
20. Hevroy, E. M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., Hemre, G. I., 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11, 301-313.

- Meseguer, J., 1998. Methods for the studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.) serum. Methodology in fish disease research. Aberdeen, 125- 127.
29. Pourgholam, M.A., Khara, H., Safari, R., Yazdani Sadati, M.A., Aramli, M.S., 2017. Influence of *Lactobacillus planetarium* inclusion in the diet of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on performance and hematological parameters. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17, 1-5.
30. Ringo, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture Journal, 160, 177-203.
31. Sahoo, P. K., Mahapatra, K. D., Saha, J. N., Barat, A., Sahoo, M., Mohanty, B. R., Salte, R., 2008. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. Fish & shellfish immunology, 25 (1-2), 163-169.
32. Shi, X., Zhuang, P., Zhang, L., Feng, G., Chen, L., Liu, j., Wang, R., 2008. Growth inhibition of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* from dietary and waterborne fluoride. Research report Fluoride, 42 (2), 137 –141.
33. Sun, Y. Zh, Yang, H. L., Ma, R. L., Lin, W. Y., 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, 29, 803-809.