بررسی تأثیر مصرف خوراکی غلظت‌های مختلف باکتری *Lactobacillus acidophilus* بر شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجه با سمیت فلز سنگین سرب در جیره‌ی غذایی

تکاور محمدیان[۱*]، محمد محیسنی[۲]، بهمن احمدی‌بابادی[۳] و سعید ضیایی‌نژاد[۴]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۰

چکیده

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به دنبال مسمومیت با سرب انجام شد. تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی با وزن تقریبی ۳/۸±۱۶ گرم انتخاب و پس از اطمینان از سلامت آن‌ها، به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند که به ترتیب با جیره‌ی غذایی حاوی ۵×۱۰^{۶}، ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۸} CFU/g باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و نیز گروه چهارم (کنترل منفی یا کنترل بدون سرب) در تمام طول آزمایش با غذای بدون هیچ‌گونه افزودنی تغذیه و نگهداری شدند و گروه پنجم (گروه کنترل سرب‌دار یا کنترل مثبت) که ابتدا بدون افزودن باکتری به جیره‌ی غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس از این مدت تا انتهای دوره‌ی آزمایش به همراه سه گروه پروبیوتیکی به مدت ۲۱ روز با جیره‌ی حاوی ۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم نیترات سرب مورد تغذیه قرار گرفتند. در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ بعد از آسان‌کشی نمونه‌برداری از روده جهت بررسی آنزیم‌های گوارشی به عمل آمد. نتایج نشان داد که ضریب تبدیل غذایی بعد از ۴۵ روز در سه گروه پروبیوتیکی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). همچنین در سایر شاخص‌های رشد مانند افزایش وزن، میزان کارایی پروتئین، ضریب رشد ویژه و نسبت بازده غذایی بعد از ۴۵ روز در گروه یک و دو پروبیوتیکی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). نتایج بررسی آنزیم‌های گوارشی نشان داد که تمامی آنزیم‌ها بعد از ۴۵ روز در سه گروه آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل بهبود معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). اما پس از مواجهه با سرب فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و تریپسین در گروه ۲ با کاهش معنی‌داری مواجهه شد اما همچنان نسبت به سایر گروه‌ها و گروه کنترل تحت چالش با سرب بیش‌تر بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های لیپاز آلکالین فسفاتاز پس از مواجهه با سرب در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی با کاهش معنی‌داری مواجهه شد اما همچنان مقدار آن نسبت به گروه کنترل تحت چالش با سرب بالاتر بود. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از روده‌ی ماهی شیربت در غلظت ۵×۱۰^{۷} CFU/gr به عنوان یک مکمل پروبیوتیکی می‌تواند دارای اثرات مثبت در بهبود شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی قزل‌آلای رنگین‌کمان حتی پس از مواجهه با مسمومیت با فلز سنگین سرب باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، قزل‌آلای رنگین‌کمان، آنزیم، سرب

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری در حال حاضر، صنعتی با رشد سریع و تولید بالا محسوب می‌شود. افزایش تراکم به منظور دستیابی به تولید بالا باعث تحمیل شرایط استرس‌زا، ایجاد بیماری و شرایط نامطلوب محیطی می‌شود که نهایتاً منجر به زیان اقتصادی خواهد شد. در حال حاضر ماهی‌ها از طریق واکسیناسیون یا درمان با مواد شیمیایی از بیماری‌های عفونی محافظت می‌شوند؛ با این حال استفاده‌ی بی‌رویه از عوامل شیمیایی موجب ایجاد

[۱*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: takavar_m2002@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیا بهبهان

[۳] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیا بهبهان

[۴] دانشیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیا بهبهان

مقاومت میکروبی، افزایش هزینه و مشکلات زیست محیطی متعدد گردیده است. از سوی دیگر رشد سریع صنایع منجر به آلودگی محیط و ایجاد مخاطرات قابل توجه برای بی‌مهرگان، ماهی‌ها و انسان شده است. فلزات سنگینی که وارد آب می‌شوند می‌توانند در زنجیره‌ی غذایی دست‌خوش تجمع زیستی و بزرگ‌نمایی زیستی شوند که منجر به ایجاد اثرات تحت کشنده یا مرگ در جمعیت‌های ماهی می‌شود. فلزات سنگین موجود در آب نه تنها بقا و فیزیولوژی موجودات آبزی را به مخاطره می‌اندازند بلکه باعث تغییرات ژنتیکی می‌شوند که می‌تواند منجر به جهش و سرطان‌زایی شود (Rayes 2012). از این رو استراتژی‌های مناسب و جایگزین همچون عوامل زنده‌ی غیر پاتوژن مثل پروبیوتیک‌ها که منجر به حذف فلزات سنگین نیز می‌شوند، پیشنهاد شده است. پروبیوتیک‌ها میکروب‌هایی هستند که وقتی به غذا اضافه شوند، بر سلامتی و رشد میزبان تأثیر مثبت می‌گذارند (Somasundaram and Vijavabaskar 2008). پروبیوتیک‌ها همواره به دلیل داشتن مزایای فراوان به عنوان یکی از راه‌های افزایش بازده‌ی آبزی‌پروری مطرح بوده‌اند. در سال‌های اخیر، جهت افزایش راندمان تولید آبزیان، محققین به دنبال معرفی پروبیوتیک‌های بهتر بوده‌اند. باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک شامل جنس‌های متنوعی همچون : Lactobacillus، Aerococcus، Pediococcus، Enterococccus، Alloicoccus، Tetragenococcus و غیره می‌باشند (Axelsson 1997). لاکتوباسیل‌ها، می‌توانند پروبیوتیک‌های مناسبی باشند که در حال حاضر دارای ۸۸ گونه و ۱۵ تحت گونه است (Coeure et al. 2003). تحقیقات اخیر نشان داده که گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، نقش قابل توجهی در مراحل هضمی دستگاه گوارش گونه‌های مختلف حیوانات بازی می‌کنند و شواهد موجود در خصوص این که حداقل برخی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌توانند متابولیسم باکتریایی روده را تغییر دهند، بسیار قوی است. برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که پروبیوتیک‌ها اثر مفیدی روی مراحل هضم در حیوانات آبزی دارند. علاوه بر این، بعضی از باکتری‌ها ممکن است در مراحل هضم غذایی موجودات آبزی مانند دوکفه‌ای‌ها، میگو و ماهی با تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئازها، لیپازها و تولید فاکتورهای ضروری رشد شرکت نمایند. مشاهدات مشابهی برای فلور میکروبی میگوی چینی گزارش شده است که آنزیم‌های کاملی برای هضم و سنتز ترکیبات تولید می‌کنند (Balcazar et al. 2006). Giri و همکاران در سال ۲۰۱۳، تأثیر دوزهای مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را بر عملکرد رشد و آنزیم‌های گوارشی در ماهی جوان *Labeo rohita* را مورد بررسی قرار دادند.

سرب یکی از فلزات سنگین سمی است که انتشار محیطی گسترده‌ای دارد و موجب ایجاد طیف وسیعی از اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی می‌گردد. در ماهیان به دلیل ورود آلودگی صنعتی به آب رودخانه‌ها علاوه بر عوارض مختلفی که مسمومیت با سرب در ارگان‌های مختلف ایجاد می‌کند، تجمع این فلز در بافت‌های خوراکی ماهی (به خصوص ماهیان پرورشی که بیش‌تر در معرض آلودگی و همچنین مصرف خوراکی انسانی می‌باشند) می‌تواند مسأله‌ی امنیت و سلامت غذایی انسان را نیز تحت تأثیر قرار دهد. اتصال یون‌های فلزی به باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها، فرآیند پیچیده‌ای است که بستگی به خصوصیات یون‌های فلزی، خصوصیات فیزیولوژی سویه باکتری‌های اسیدلاکتیک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی محیط (pH، درجه‌ی حرارت، غلظت یون‌های فلزی) دارد که از طریق جذب و تجمع زیستی این کار را انجام می‌دهند (Mrvčić 2012). مکانیسم‌های دخیل در جذب زیستی فلزات سنگین شامل تشکیل کمپلکس، تبادل یونی، جذب، دفع (چلاته سازی) و ریزترسیب می‌باشد. با توجه به پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک در اتصال و برداشت فلزات سنگین در شرایط *in vivo* و *in vitro* و طبیعت غیر بیماری‌زای این باکتری‌ها (Kinoshita et al. 2013) و این که تا کنون در کشور مطالعه‌ی جامعی در این زمینه انجام نگرفته است،

تحقیق حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر رشد و تأثیر آن در فرایند تولید آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر سمیت فلز سنگین سرب در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طراحی شده است.

مواد و روش کار

تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۳/۸±۱۶ گرم به آزمایشگاه دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و مدت دو هفته در شرایط استاندارد به منظور تطبیق‌پذیری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. طی دوره‌ی عادت‌پذیری ماهی‌ها با جیره‌ی تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان روزانه دو بار و به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. پس از طی دوره‌ی عادت‌پذیری ماهی‌ها به پنج گروه (با سه تکرار) تقسیم‌بندی شدند. گروه اول با جیره‌ی غذایی حاوی 5×10^{6} CFU/gr باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (جدا شده از دستگاه گوارش ماهی شیربت)، گروه دوم با جیره‌ی غذایی حاوی 5×10^{7} CFU/gr باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و گروه سوم با جیره غذایی حاوی 5×10^{8} CFU/gr باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به مدت ۴۵ روز تغذیه و نگهداری شدند. پس از اتمام این دوره به غذای هر سه گروه علاوه بر پروبیوتیک مقدار ۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم خوراک نیترات سرب به مدت ۲۱ روز اضافه شد (Mohammadian et al. 2016). گروه چهارم (کنترل منفی یا کنترل بدون سرب) در تمام طول آزمایش با غذای بدون هیچ‌گونه افزودنی تغذیه و نگهداری شدند. گروه پنجم (گروه کنترل سرب‌دار یا کنترل مثبت) ابتدا بدون افزودن باکتری به جیره‌ی غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس از این مدت تا انتهای دوره‌ی آزمایش در معرض فلز سرب (۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم خوراک نیترات سرب) قرار گرفتند. اضافه کردن پروبیوتیک به غذای تجاری مطابق با دستورالعمل استاندارد انجام شد (Planas et al. 2004). نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ انجام شد. کیفیت آب در طول دوره‌ی پرورش در حدی قابل قبول و تقریباً ثابت بود. شستشوی مخازن نیز به طور روزانه صورت گرفت. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل اکسیژن، دما، pH، شوری و هدایت الکتریکی به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. پارامترهای کیفی آب از قبیل آمونیاک، نیترات نیز به صورت هفتگی مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین دمای آب حوضچه‌ها در طول دوره‌ی پرورش ۲/۵±۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۵–۸/۳ بود.

جهت آماده‌سازی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Vine و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده گردید. به طور خلاصه هر کدام از باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با عمل سانتریفیوژ جداسازی و شستشو گردیده و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها بر روی 3×10^{9} CFU/ml تنظیم شد و سپس به طریق تهیه رقت‌های متوالی، غلظت مورد نظر به هر گرم غذا اسپری گردید. غذاها در شرایط کاملاً استریل به میزان لازم وزن شده و در سینی‌های استریل قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت با رعایت شرایط استریل در دمای آزمایشگاه خشک شده و بسته‌بندی گردیدند. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده‌ی موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل، انجام گردید. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد (Mohammadian et al. 2017).

در روز ۴۵ آزمایش با استفاده از ماده بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) تمامی ماهیان بیهوش شدند. پس از وزن‌کشی و بیومتری ماهیان با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) و خط‌کش مدرج حرفه‌ای، شاخص‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفت.

ضریب رشد ویژه (SGR) = ۱۰۰× (دوره پرورش به روز / $(\ln w_2 - w_1)$

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

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

فاکتور وضعیت (CF) = ۱۰۰× [(طول کل ماهی cm) / L^3 (وزن ماهی g) W]

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

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

میزان رشد نسبی (*RGR*) = ۱۰۰× (وزن نهایی (g) − وزن اولیه (g) / وزن اولیه (g)) (Mohammadian et al. 2017).

نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان، (یک سانتی‌متر بعد از حباب روده‌ای) در روز صفر (شروع آزمایش)، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت گیرد. سپس بلافاصله در دمای ۱۹۶- °c (تانک ازت مایع) نگهداری شدند (Kuz'mina et al. 2010). نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از تانک ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی- حجمی) محلول بافر هموژن (برای ساخت بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، کیموتریپسین، آلفا- آمیلاز و لیپاز)، ۱۰۰ mM Tris-Hcl، ۰/۱ mM EDTA، ۰/۱ Triton 100X درصد در pH ۷/۸ ترکیب گردید) سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند (Cahu et al. 1999, Mohammadian et al. 2017).

نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به داخل اپندورف‌ها ریخته شده و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰rpm، به مدت ۱۰ دقیقه) گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره- ی آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (Rungruangsak-Torrissen et al. 2002).

برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول ۵۰ mM، بافر ۲ mM HCl-Tris در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی استفاده گردید و به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد (Cahu et al. 1999). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، کلرید کلسیم ۰/۱ M به هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید.

فعالیت ۴ آنزیم گوارشی آلفا-آمیلاز، تریپسین، لیپاز، فسفاتاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. از آن جایی که آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و در دسته‌ی پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، لذا محاسبات فعالیت آنزیمی بر اساس پروتئین محلول انجام گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم ترپسین، از سوبسترای N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N- بنزوئیل-L- آرژنین تبدیل می‌شود. نتایج در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت نوری صورت گرفت (Erlanger et al. 1961). ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰µl از اسید کلریدریک ۱mM مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمای ۲۵°c قرار گرفتند. بعد نمونه به میزان ۳۰µl از نمونه‌ی رقیق شده اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل 2802 UV) در طول موج ۲۵۳ nm انجام شد.

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 (Worthington 1991). ابتدا ۲۵۰µl از عصاره‌ی آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله‌ی آزمایشی و ۲۵۰µl آب مقطر نیز به لوله‌ی 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 درصد 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 ۵۴۰ نانومتر 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) به دست آمد. واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Bernfeld 1955).

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington در سال ۱۹۹۱ استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به عنوان سوبسترا استفاده گردید. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر ۰/۸ M Tris-Hcl، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ mM و معرف تیمول‌فتالئین ۰/۹ درصد استفاده شد.

جهت سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت زیست-شیمی (Ref: 10-503) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بیکربنات را با یک قسمت محلول معرف ۰/۱ M Para-nitrophenylphosphate مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷°c قرار داده شد تا هم دمایی صورت گیرد. میزان ۰/۵ ml از این مخلوط را با ۲۰ µl محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °c قرار میدهیم تا انکوبه شود. پس از این زمان ۵ ml محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ۴۰۵ nm اندازه‌گیری شد. شاهد نیز مانند نمونه‌ی بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله‌ی آزمایش اضافه شد.

برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد و تأثیر پروبیوتیک بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی بین ۵ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک و دو طرفه با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. همچنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

شاخص‌های رشد

نتایج حاصل از تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلا در جدول ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان رشد نسبی بعد از ۴۵ روز مربوط به گروه ۲ بود که با گروه ۳ و کنترل اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان رشد روزانه، میزان کارایی پروتئین و ضریب رشد ویژه در روز ۴۵ آزمایش نیز به ترتیب مربوط به تیمار پروبیوتیکی ۲ و ۱ بود که با گروه ۳ و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). در روز ۴۵ آزمایش، گروه ۲ بهترین ضریب تبدیل غذایی را داشت و با سایر گروه‌های پروبیوتیکی اختلاف معنی-داری نداشت ($p\geq۰/۰۵$) اما با گروه کنترل اختلاف معنی-دار به وضوح مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فاکتور وضعیت در روز ۴۵ آزمایش، بالاترین میزان را در گروه ۲ داشته است و تنها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱: مقایسه‌ی شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی پس از ۴۵ روز از انجام آزمایش (نتایج بر اساس Mean±SD گزارش شده‌اند)

شاخص	گروه یک	گروه دو	گروه سه	گروه چهار
افزایش وزن	۴۲/۲۳±۲/۹۴^{a}	۴۵/۶۵±۲/۶۴^{a}	۲۶/۴۷±۴/۲۸^{b}	۲۳/۱۸±۲/۱۸^{b}
میزان رشد نسبی	۲۵۴/۴۶±۱۹/۱۷^{a}	۲۶۰/۷۸±۶۶/۵۸^{a}	۱۰۹/۰۲±۱۷/۹۲^{b}	۱۰۶/۲۲±۴۵/۶۸^{b}
میزان رشد روزانه	۰/۹۴±۰/۲۲^{a}	۱/۰۱±۰/۱۴^{a}	۰/۵۹±۰/۱۵^{b}	۰/۵۲±۰/۱۹^{b}
ضریب رشد ویژه	۱/۲۲±۰/۰۵^{a}	۱/۲۳±۰/۱۹^{a}	۰/۷۱±۰/۰۸^{b}	۰/۶۸±۰/۲۲^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۰/۶۷±۰/۱۴^{b}	۰/۳۸±۰/۰۷^{b}	۰/۵۷±۰/۱۷^{b}	۱/۶۶±۰/۸۱^{a}
فاکتور وضعیت	۱/۰۷±۰/۱۰^{ab}	۱/۲۰±۰/۰۵^{a}	۱/۰۳±۰/۰۹^{b}	۱/۰۲±۰/۰۹^{b}
میزان کارایی پروتئین	۴/۱۷±۰/۸۶^{b}	۵/۷۶±۰/۹۰^{a}	۲/۴۰±۰/۵۹^{c}	۱/۶۵±۰/۶۶^{c}
نسبت بازده غذایی	۱۷۴/۷۹±۳۶/۲۱^{b}	۲۴۱/۱۴±۳۷/۴۸^{a}	۱۰۰/۶۰±۲۴/۹۵^{c}	۶۹/۱۵±۲۷/۵۳^{c}

حروف لاتین ناهمنام در هر سطر دارای اختلاف معنی‌دار هستند (p<۰/۰۵)

آنزیم‌های گوارشی

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی در جدول ۲ آورده شده است . بیان فعالیت اختصاصی آنزیم‌های گوارشی بر اساس فعالیت آنزیمی (U) بر میزان پروتئین (mg) بوده است.

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

نتایج نشان دهنده‌ی آن است که فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز به دنبال مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش یافته است (p<۰/۰۵). در روز ۴۵ میزان فعالیت این آنزیم در گروه دو نسبت به دیگر گروه‌ها و در گروه یک و سه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است (p<۰/۰۵). به دنبال مصرف سرب فعالیت آمیلاز در روز ۵۲ در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی، در روز ۵۹ در گروه یک و سه و در روز ۶۶ در گروه یک نسبت به گروه کنترل سرب‌دار افزایش معنی‌داری یافته است (p<۰/۰۵).

فعالیت آنزیم تریپسین

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر فعالیت تریپسین ۴۵ روز پس از مصرف پروبیوتیک در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش یافته است اما این افزایش فقط در گروه دو نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). پس از مواجهه با سرب تغییر معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوتیکی و گروه کنترل مثبت مشاهده نشده است.

فعالیت آنزیم لیپاز

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر میزان فعالیت آنزیم لیپاز به دنبال مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش یافته است (p<۰/۰۵). از بین گروه-های پروبیوتیکی میزان فعالیت لیپاز در روز ۴۵ در گروه یک و سه نسبت به گروه دو بیش‌تر بوده است (p<۰/۰۵). پس از مواجهه با سرب میزان فعالیت این آنزیم در روز ۵۲ در گروه یک و دو و در روز ۵۹ و ۶۶ در گروه یک نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار داشته است (p<۰/۰۵).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

نتایج مربوط به فعالیت آلکالین فسفاتاز نشان داد که پس از ۴۵ روز میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های

پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$). پس از مصرف سرب در روزهای ۵۲ و ۶۶ در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی و در روز ۵۹ در گروه‌های یک و دو میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌داری یافته است ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مراحل مختلف نمونه‌گیری

شاخص	گروه‌ها	روز صفر	روز ۴۵	روز ۵۲	روز ۵۹	روز ۶۶
آلفا- آمیلاز u/mg protein	گروه یک	۰/۰۸±۰/۰۱^{c,A}	۰/۷۹±۰/۲۲^{a,B}	۰/۵۶±۰/۱۹^{ab,C}	۰/۵۹±۰/۲۰^{ab,A}	۰/۴۷±۰/۲۱^{b,A}
	گروه دو	۰/۰۸±۰/۰۱^{c,A}	۱/۲±۰/۶۰^{a,A}	۱/۰۸±۰/۲۱^{a,A}	۰/۴۲±۰/۱۶^{b,ABC}	۰/۲۹±۰/۱۲^{bc,B}
	گروه سه	۰/۰۸±۰/۰۲^{c,A}	۰/۶۳±۰/۲۰^{b,B}	۰/۸۲±۰/۲۰^{a,B}	۰/۴۷±۰/۱۷^{b,AB}	۰/۱۵±۰/۰۲^{c,B}
	گروه چهار	۰/۰۸±۰/۰۱^{c,A}	۰/۱۳±۰/۰۵^{bc,C}	۰/۱۹±۰/۰۹^{b,D}	۰/۳۱±۰/۰۹^{a,BC}	۰/۱۵±۰/۰۵^{bc,B}
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۰/۱۵±۰/۰۷^{b,D}	۰/۲۵±۰/۰۹^{a,C}	۰/۱۳±۰/۰۵^{b,B}
تریپسین u/mg protein	گروه یک	۰/۰۸±۰/۰۱^{a,A}	۰/۱۲±۰/۰۲^{a,A}	۰/۱۰±۰/۰۵^{a,AB}	۰/۰۹±۰/۰۲^{a,A}	۰/۱۰±۰/۰۵^{a,A}
	گروه دو	۰/۰۷±۰/۰۲^{c,A}	۰/۱۴±۰/۰۴^{a,A}	۰/۱۱±۰/۰۴^{ab,AB}	۰/۰۸±۰/۰۱^{bc,A}	۰/۰۶±۰/۰۲^{c,A}
	گروه سه	۰/۰۹±۰/۰۱^{bc,A}	۰/۱۲±۰/۰۵^{ab,A}	۰/۱۳±۰/۰۳^{a,A}	۰/۰۸±۰/۰۳^{bc,A}	۰/۰۷±۰/۰۰^{c,A}
	گروه چهار	۰/۰۷±۰/۰۳^{a,A}	۰/۰۷±۰/۰۰^{a,B}	۰/۰۹±۰/۰۳^{a,AB}	۰/۰۹±۰/۰۱^{a,A}	۰/۰۸±۰/۰۱^{a,A}
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۰/۰۸±۰/۰۲^{a,B}	۰/۰۸±۰/۰۱^{a,A}	۰/۰۷±۰/۰۱^{a,A}
لیپاز u/mg protein	گروه یک	۰/۱۰±۰/۰۳^{b,A}	۰/۷۴±۰/۲۵^{a,A}	۰/۱۴±۰/۰۵^{b,B}	۰/۱۸±۰/۰۸^{b,A}	۰/۰۸±۰/۰۴^{b,A}
	گروه دو	۰/۱۲±۰/۰۸^{b,A}	۰/۳۷±۰/۱۱^{a,B}	۰/۳۲±۰/۱۱^{a,A}	۰/۱۶±۰/۰۶^{b,AB}	۰/۰۷±۰/۰۲^{b,AB}
	گروه سه	۰/۱۱±۰/۰۳^{b,A}	۰/۵۸±۰/۰۴^{a,A}	۰/۵±۰/۰۲^{a,A}	۰/۱۴±۰/۰۸^{b,AB}	۰/۰۵±۰/۰۲^{c,AB}
	گروه چهار	۰/۱۰±۰/۰۴^{a,A}	۰/۱۲±۰/۰۳^{a,C}	۰/۰۴±۰/۰۷^{b,C}	۰/۰۹±۰/۰۱^{a,B}	۰/۰۵±۰/۰۲^{b,AB}
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۰/۰۴±۰/۰۲^{b,C}	۰/۰۸±۰/۰۱^{a,B}	۰/۰۴±۰/۰۲^{b,B}
آلکالین‌فسفاتاز u/mg protein	گروه یک	۰/۰۵±۰/۰۲^{c,A}	۰/۲۷±۰/۰۸^{a,A}	۰/۱۳±۰/۰۵^{b,A}	۰/۰۵±۰/۰۱^{c,B}	۰/۰۹±۰/۰۲^{bc,A}
	گروه دو	۰/۰۵±۰/۰۳^{b,A}	۰/۲۱±۰/۰۷^{a,A}	۰/۱۱±۰/۰۳^{b,A}	۰/۱۱±۰/۰۱^{b,A}	۰/۰۹±۰/۰۱^{b,A}
	گروه سه	۰/۰۵±۰/۰۲^{c,A}	۰/۲۱±۰/۰۸^{a,A}	۰/۱۰±۰/۰۳^{b,AB}	۰/۰۲±۰/۰۰^{c,C}	۰/۰۷±۰/۰۱^{bc,AB}
	گروه چهار	۰/۰۴±۰/۰۱^{a,A}	۰/۰۵±۰/۰۱^{a,B}	۰/۰۶±۰/۰۲^{a,BC}	۰/۰۴±۰/۰۲^{a,BC}	۰/۰۶±۰/۰۲^{a,BC}
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۰/۰۵±۰/۰۲^{a,C}	۰/۰۳±۰/۰۲^{b,C}	۰/۰۴±۰/۰۱^{ab,C}

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.

بحث

امروزه استعمال پروبیوتیک‌ها در تغذیه‌ی انسان و دام-ها به خوبی ثابت شده است و در صنعت آبزی‌پروری نیز رواج یافته است (Safari et al. 2016). مکمل‌سازی جیره‌ی غذایی با باکتری‌های پروبیوتیکی به صورت فرآورده‌های میکروبی تجاری و یا باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش آبزیان می‌تواند باعث افزایش وزن و بهبود عملکرد تغذیه گردد (Mohammadian et al. 2017). طبق نظر محققین یکی از اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها در موجودات زنده، بهبود تغذیه‌ی میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی و مکمل‌های رشد و در نتیجه افزایش

بقا، بازده‌ی غذایی، جلوگیری از اختلالات روده‌ای و پیش هضم عوامل تغذیه‌ای موجود در مواد تشکیل دهنده‌ی غذا است. همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق سم‌زدایی ترکیبات مضر موجود در جیره به وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی و تولید ویتامین‌هایی مانند بیوتین و ویتامین B_{12} تغذیه را بهبود بخشند. در مجموع به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها، با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه‌ی لوله‌ی گوارش ماهی‌ها باعث افزایش قابلیت هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش کارایی تغذیه‌ای گشته‌اند و بهره‌برداری از غذا را حتی در شرایط استرس نیز افزایش می‌دهند و با تعادل رساندن میکروفلور دستگاه گوارش، باعث افزایش شاخص‌های رشد گشتند (Suzer et al. 2008).

در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد که در تمام شاخص‌های رشد مورد بررسی، تیمار ۵×۱۰^{۶} و به خصوص ۵×۱۰^{۷} CFU/gr از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در جیره‌ی ماهی *قزل‌آلای رنگین‌کمان* بالاترین تأثیر را داشته است. در بررسی افزایش وزن روزانه و درصد افزایش وزن نسبی بدن در روز ۴۵ دیده می‌شود که تیمار شاهد و تیمار ۵×۱۰^{۸} CFU/gr اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. افزایش شاخص‌های رشد به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها در تحقیقات مختلف گزارش شده است. در توافق با نتایج مطالعه‌ی حاضر، Giri و همکاران در سال ۲۰۱۳، که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را در ۳ غلظت به جیره‌ی غذایی ماهی *Labeo rohita* اضافه کرده بودند، WG (افزایش وزن) و FCR (ضریب تبدیل غذایی) در مدت ۶۰ روز افزایش معنی‌داری را نشان دادند به طوری که در غلظت $CFU\ g^{-1}$ $۱۰^{۸}$ یا $۱۰^{۱۰}$، SGR افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین نتایج مشابهی توسط Lee و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر مارماهی ژاپنی، Cha و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر کفشک زیتونی، Ramos و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Suzer و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر ماهی شانک سر طلایی، Son و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر ماهی هامور معمولی، Venkat و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر میگوی روزنبرگی نتایج مشابهی با نتایج بررسی حاضر دست یافتند. مطالعه‌ی Al-Doh و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به میزان ۳×۱۰^{۷} CFU/gr غذا در *گربه ماهی آفریقایی* (*Clarias gariepinus*) به مدت ۱۲ هفته موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شود. در این مطالعه نیز وزن نهایی حاصل شده، میزان رشد نسبی، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان کارایی پروتئین بهبود یافت. نتایج مطالعه‌ی Aly و همکاران ۲۰۰۸ نیز حاکی از آن است که مقدار ۱×۱۰^{۷} باکتری بر گرم از پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* موجب افزایش وزن نهایی در ماهی *تیلاپیای نیل* (*Oreochromis niloticus*) می‌شود. نتایج مطالعه‌ی ایمانپور و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ماهی *کُلمه خزر* (*Rutilus rutilus*) و سلاقی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ماهی *قره برون* (*Acipenser persicus*) نشان داد که استفاده از مکمل پروبیوتیکی پریمالاک که مخلوطی از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *انتروکوکوس فاسیوم* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* با نسبت مشابه است، موجب بهبود شاخص‌های مربوط به رشد می‌شود. نتیجه‌ای که در مطالعه‌ی حاضر به دست آمد حاکی از آن بود که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت‌های پایین‌تر توانسته تأثیر بیشتری در عملکرد رشد داشته باشد که احتمالاً این نتیجه را به استقرار و کلونیزه بهتر این باکتری در غلظت ۵×۱۰^{۷} CFU/gr نسبت غلظت بالاتر نسبت داد. پروبیوتیک‌ها پس از عبور از معده و استقرار در روده از کربوهیدرات‌ها برای رشد خود استفاده کرده و با تولید آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) باعث افزایش هضم‌پذیری مواد آلی و پروتئین‌ها می‌شوند که حاصل آن رشد بیش‌تر و پیش‌گیری از اختلالات روده است. در برخی موارد پروبیوتیک با تأمین اسیدهای چرب و ویتامین‌ها به تغذیه‌ی میزبان کمک می‌کنند. در مطالعه‌ی Lara و همکاران ۲۰۰۳ پس از مصرف

پروبیوتیک فعالیت آلکالین فسفاتاز در ماهی *تیلاپیای نیل* (*Oreochromis niloticus*) افزایش یافت که حاصل آن رشد ریزپرزهای غشای انتروسیت‌ها و جذب بهتر کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و نهایتاً افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل غذایی بود.

تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد مؤثر باشد (Sunde et al. 2001). از فعالیت آنزیم‌های هضمی به عنوان شاخصی جهت تفاوت‌های رشدی و مصرف غذا یاد می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر استفاده از غلظت‌های مختلف *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، تریپسین، آلکالین فسفاتاز و لیپاز، نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در تیمارهای آزمایشی تا روز ۴۵ دوره‌ی پرورش نسبت به تیمار شاهد بود.

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، جذب و مصرف غذا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Suzer et al. 2008). همین‌طور تأثیر پری‌بیوتیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بررسی‌های محققین مختلف بر روی آبزیان دیده شده است (Soleimani et al. 2012). بنابراین، باکتری‌های ذکر شده با شرکت در فرایند 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 است که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند، لذا احتمالاً باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (به خصوص گروه ۲) توانسته‌اند به این وسیله سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره‌ی غذایی بچه ماهیان قزل‌آلا شوند و به خصوص فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و پس از آن تریپسین که از پروتئازها هستند را افزایش دهند. در مطالعه‌ی Hauville و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که استفاده از مخلوط گونه‌های *باسیلوس* به عنوان پروبیوتیک در غذای زنده و آب پرورش لارو ماهیان Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) و Common snook (*Centropomus undecimalis*) می‌تواند با افزایش آنزیم‌های گوارشی نظیر تریپسین و آلکالین فسفاتاز و با تسریع روند بلوغ اجزای دستگاه گوارش مانند روده و پانکراس موجبات افزایش توان جذب و بهبود استفاده از مواد غذایی و رشد بهتر را فراهم آورد. احتمالاً می‌توان نتیجه گرفت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت 5×10^{6} و به خصوص 5×10^{7} CFU/gr توانایی بیش‌تری در تولید آنزیم‌های خارج سلولی پروتئاز، یا هضم و جذب بیش‌تر پروتئین‌ها و یا تحریک بیش‌تر دستگاه گوارش قزل‌آلا به ترشح بیش‌تر پروتئازها داشته‌اند. بین تیمار ۲ آزمایشی و سایر تیمارهای پروبیوتیکی در فعالیت آنزیم لیپاز در روز ۴۵ یک کاهش معنی‌داری مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تحریک کم‌تر دستگاه گوارش توسط این غلظت باکتری نسبت به دو غلظت دیگر، منجر به تولید آنزیم لیپاز کم‌تری شد.

ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب جهت مقایسه‌ی ضریب رشد ماهی، پذیرش غذا و همچنین ظرفیت گوارشی، مورد استفاده واقع شود. با توجه به تولید آنزیم‌های گوارشی توسط دستگاه گوارش بچه ماهیان قزل‌آلا و همچنین تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شده در این آزمایش، نمی‌توان سهم فعالیت آنزیمی ناشی از فعالیت باکتری‌ها و تولید آنزیم توسط بچه ماهیان را تفکیک نمود (Suzer et al. 2008). به نظر می‌رسد غلظت 5×10^{7} CFU/gr (به میزان بیش‌تر) و 5×10^{6} (به میزان کم‌تر) با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه‌ی دستگاه گوارش بچه ماهیان قزل‌آلا باعث افزایش قابلیت هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش ضریب رشد ویژه گشته‌اند. لازم به ذکر است که پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت 5×10^{7} CFU/gr هم در میزان آنزیم‌های

گوارشی (نسبت به سایر غلظت‌ها) و هم دارای بهترین عملکرد شاخص‌های رشدی در میان تیمارهای آزمایشی بود. همان‌گونه که از نتایج این آزمایش مشخص است، احتمالاً تیمار *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت 5×10^{7}CFU/gr توانسته‌اند فلور غالبی را در روده‌ی ماهی قزل‌آلا ایجاد کند و به تبع آن باکتری‌های اسید لاکتیک نیز افزایش یافته‌اند و شاخص‌های رشدی را نسبت به دو غلظت باکتری دیگر، بیش‌تر تحت تأثیر قرار داده است. از طرف دیگر نتایج این مطالعه نشان داد که پس از روز ۴۵ آزمایش و مواجهه تیمارها با فلز سنگین سرب، فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گروه‌های پروبیوتیکی مواجهه یافته با سرب به نسبت گروه کنترل سرب‌دار بهبود یافته است اما میزان فعالیت تمامی آنزیم‌ها در تمامی تیمارها نسبت به روز ۴۵ کاهش یافت. در راستای نتایج مطالعه‌ی حاضر مطالعه Sastry و Gupta در سال ۱۹۷۸ نشان داد که فلز سنگین جیوه باعث مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی نظیر آلکالین فسفاتاز، لیپاز، آمینوتریپپتداز و گلیسیل‌گلیسین دی‌پپتیداز در ماهی *Channa punctatus* می‌شود و مهار این آنزیم‌ها با افزایش غلظت جیوه افزایش می‌یابد. این امر به اتصال فلزات سنگین به مولکول‌های زیستی، آسیب بافتی و کاهش ساخت این آنزیم‌ها نسبت داده شد. همچنین در مطالعه‌ی Crespo و همکاران در سال ۱۹۸۶ مشخص شد که پس از مواجهه با سرب تغییرات ریخت‌شناسی در روده‌ی ماهی *قزل آلا* نظیر افزایش تعداد سلول‌های گابلت، ادم و اتساع عروق، مهار فعالیت آنزیم Na, K-ATPase، تخریب زوائد مسواکی روده و متعاقباً اختلال در جذب روده مشاهده می‌شود. با توجه به اثرات نامطلوب فلزات سنگین در موجودات مواجه شونده، فرآیندها و عواملی که بتوانند موجب حذف و کاهش این فلزات در بدن شوند، مفید خواهند بود. توانایی جنس‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) در جذب فلزات سنگین از سطح دیواره‌ی سلولی (Biosorption) یا تجمع این فلزات در درون سلول آن‌ها (Bioaccumulation) توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود معطوف نموده است (Gerbino 2014). ساز و کارهایی در خصوص مقاومت به فلزات سنگین توسط عوامل میکروبی پیشنهاد شده است. اغلب این مکانیسم‌ها موجب کاهش حرکت و جریان فلزات سنگین می‌شوند (Panwichian et al. 2011). در این مطالعه مشاهده گردید که فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گروه کنترل تحت چالش (گروه پنج) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تغذیه شده با غذای فاقد سرب نشان داد. این نتایج احتمالاً حاکی از اثر تخریبی فلز سنگین سرب بر ساختار سلول‌های ترشحی روده و حتی قسمت برون‌ریز بافت پانکراس و فلور میکروبی دستگاه گوارش می‌باشد. Singh و Sharma در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قادر به اتصال و برداشت فلز ارسنیک از آب است و حداکثر برداشت ارسنیک ۴ ساعت بعد از مواجهه بود. همچنین در مطالعه‌ی Elsanhoty و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشاهده شد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* یک باکتری با توانایی بالا در کاهش میزان فلزات سنگین آب آلوده است. در مورد سایر فلزات سنگین نیز به کار گیری لاکتوباسیل‌ها و بیان مکانیسم آن‌ها در جهت کاهش فلزات صورت گرفته است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که در مجموع استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از روده‌ی ماهی شیربت به عنوان یک مکمل پروبیوتیکی می‌تواند دارای اثرات مثبت در بهبود شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی باشد. در مطالعه‌ی حاضر باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در غلظت 5×10^{7} CFU/gr احتمالاً توانسته با اتصال به فلز سنگین سرب در کاهش اثرات مضر آن مؤثر باشد و به عنوان غلظت مناسب جهت استفاده در آبزی‌پروری در آب‌هایی با احتمال آلودگی با فلزات سنگین استفاده گردد.

منابع

Al-Dohail, M.A.; Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerlings. Aquaculture Research, 40 (11): 1642-1652.

Aly, S.M.; Abdel-Galil, A.Y.; Abdel-Aziz, Gh.A. and 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 and Shellfish Immunology, 25 (1-2): 128-136.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S and Von Wright A (Eds) Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed. New York. Marcel Dekker, Pp: 1-72.

Balcazar, J.L.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vandrell, D. and Muzquiz, J.L. (2006). Review: The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114 (3-4): 173-186.

Bernfeld, P. (1955). Amylases α and β. In: Methods in enzymology. Colowick, P and Kaplan, N.O. (Eds). 1st ed. New York. Academic press, Pp: 149-157.

Cha, J.; Rahimnejad, S.; Yang, S.; Kim, K. and Lee, K. (2013). Evaluations of Bacillus spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. Aquaculture, 402-403: 50-57.

Cahu, C.L.; Zambonino Infante, J.L.; Quazuguel, P. and Le Gall, M.M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture, 171 (1-2): 109-11.

Crespo, S.; Nonnotte, G.; Colin, D.A.; Leray, C.; Nonnotte, L. and Aubre, A. (1986). Morphological and functional alterations induced in trout intestine by dietary cadmium and lead. Journal of Fish Biology, 28 (1): 69-80.

Elsanhoty, R.M.; Al-Turki, I.A. and Ramadan, M.F. (2016). Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. Water Science and Technology, 74 (3): 625-38.

Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95 (2): 271-278.

Gerbino, E.; Carasi, P.; Tymczyszyn, E. and Gómez-Zavaglia, A. (2014). Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. Journal of Dairy Research, 81 (3): 280-287.

Giri, S.S.; Sukumaran, V. and Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish snd Shellfish Immunology, 34 (2): 660-666.

Hauville, M.R.; Zambonino, J.L.; Gordon, B.J.; Migaud, H. and Main, K.L. (2016). Effects of a mix of *Bacillus* sp. as a potential probiotic for Florida pompano, common snook and red drum larvae performances and digestive enzyme activities. Aquaculture Nutrition, 22(1): 51-60.

Kinoshita, H.; Sohma, Y.; Ohtake, F.; Ishida, M.; Kawai, Y.; Kitazawa, H. et al. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. Research in Microbiology, 164 (7): 701-709.

Kuz'mina, V.; Shekovtsova, N. and Bolobonina, V. (2010). Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. The Biological Bulletin, 37 (6): 605-611.

Lee, J.; Cheng, H.; Damte, D.; Lee, S.; Kim, J.; Rhee, M. et al. (2013). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. Fish and Shellfish Immunology, 34 (3): 756-761.

Mohammadian, T.; Alishahi, M.; Tabandeh, M.R.; Ghorbanpoor, M.; Gharibi, D.; Tollabi, M. and Rohanizade, S. (2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aquaculture International, 24(1): 225-242.

Mohammadian, T.; Alishahi, M.; Tabandeh, M.R.; Ghorbanpoor, M.; Gharibi, D.; Tollabi, M. and Rohanizade, S. (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 Sciences, 16 (1): 296-317.

Mrvčić, J.; Stanzer, D.; Šolić, E. and Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28 (9): 2771-2782.

Panwichian, S.; Kantachote, D.; Wittayaweerasak, B. and Mallavarapu, M. (2011). Removal of heavy metals by exopolymeric substances produced by resistant purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds. Electronic Journal of Biotechnology, 14 (4): 2-2.

Planas, M.; Vazquez, J.A.; Marques, J.; Peres-Lomba, R.; Gonzalez, M.P. and Murado, M. (2004). Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240 (1-4): 313-329.

Ramos, M.A.; Weber, B.; Gonçalves, J.F.; Santos, G.A.; Rema, P. and Ozório, R.O.A. (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 166 (2): 302-307.

Rayes, A.A.H. (2012). Field studies on the removal of lead, cadmium and copper by the use of probiotic lactic acid bacteria from the water for culturing marine tilapia *T. spilurus*. New York Science Journal, 5 (11): 74-82.

Rungruangsak-Torrissen, K.; Rustad, A.; Sunde, J.; Eiane, S.A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J. et al. (2002). In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82 (6): 644-654.

Safari, R.; Adel, M.; Lazado, C.C.; Caipang, C.A.M. and Dadar, M. (2016). Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. Fish and Shellfish Immunology, 52: 198-205.

Sastry, K.V. and Gupta, P.K. (1978). In vitro inhibition of digestive enzymes by heavy metals and their reversal by chelating agent: Part I. Mercuric chloride intoxication. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 20 (1): 729-735.

Singh, A.L. and Sarma, P.N. (2010). Removal of arsenic (III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. Bioremediation Journal, 14 (2): 92-97.

Soleimani, N.; Hoseinifar, S.H.; Merrifield, D.L.; Barati, M. and Hassan Abadi, Z. (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 and shellfish immunology, 32 (2): 316-21.

Son, V.M.; Chang, C.C.; Wu, M.C.; Guu, Y.K.; Chiu, C.H. and Cheng, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, 26 (5): 691-698.

Sunde, J.; Taranger, G. and Rungruangsak-Torrissen, K. (2001). Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Fish Physiology and Biochemistry, 25 (4): 335-345.

Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, S.; Firat, K. and Otgucuoğlu, Ö. (2008). *Lactobacillus* spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata,L.*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280 (1-4): 140-5.

Venkat, H.K.; Sahu, N.P. and Jain, K.K. (2004). Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research, 35 (5): 501-507.

Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila.* Biotechnology, 7 (1): 124-128.

Vine, N.G.; Leukes, W.D.; Kaiser, H.; Daya, S.; Baxter, J. and Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculrue candidate probiotic and pathogenic bacaetia on fish interstinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27 (6): 319-326.

Worthington, C.C. (1991). Worthigton enzyme manual related Biochemical. New Jersy. 3rd ed. Freehold, Pp: 212-215.

Effect of oral administration of different concentrations *Lactobacillus acidophilus* on growth performance and digestive enzyme rainbow trout fish (*Oncorhynchus mykiss*) in the face of lead toxicity in the diet

Mohammadian, T.[1]; Mohiseni, M.[2]; Ahmadi, B.[3] and Zeai Nejadt, S.[4]

Received: 17.04.2017 Accepted: 01.11.2017

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance and digestive enzymes activity of juveniles *Oncorhynchus mykiss* after lead poisoning. 375 fish about 16±3.8 g of weight were selected and after being physically examined and ensuring their health were divided randomly in to 5 groups including 3 groups which were fed by healthy food containing 5×10^6, 5×10^7 and 5×10^8 CFU/g *Lactobacillus acidophilus* for 45 days And also the fourth group (negative control or uncontrolled control) were fed and stored throughout the experiment with food without any additives And the fifth group (positive control or control group with lead), at first were fed without any additive to the diet for 45 days, and then, until the end of the experiment period, with three probiotic groups for 21 days were fed with a diet containing 500 µg/kg lead nitrate. Intestine samples after anesthesia were collected on days 0, 45, 52, 59 and 66 for digestive enzymes were examined. Results showed that In the Treatment 1 and 2, Specific Growth Ratio, Daily Weight Growth and Relative Growth Rate, after 45 days beginning of experiment, improved considerable that compared to control group had significantly difference ($P<0.05$). Activity of digestive enzyme in trial treatment (1, 2, and 3) after 45 days, were increased significantly compared to control group ($P<0.05$). But after challenge with lead, trypsine and α-Amylase decrease significantly in groups 1 and 2 but in upper than the other groups. The lipase enzyme and alkaline phosphatase activity in all the probiotic groups after exposure to lead to a significant decrease but more than control group was challenged to lead. According to obtained results, it might be concluded that the feeding of rainbow trout by 5×10^7 CFU / gr *Lactobacillus acidophilus* isolated from the intestinal *Tor grypus* could be used as a probiotic supplement and can have a positive impact on improving growth performance and digestive enzymes and in addition are preventing of heavy metal poisoning which exist in diet.

Key word: Probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, *Oncorhynchus mykiss*, Enzyme, Lead

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbaham Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
3- MSc. Graduated of Fisheries Faculty of Natural Resources, Behbaham Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
4- Associated Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbaham Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
Corresponding Author: Mohammadian, T., E-mail: takavar_m2002@yahoo.com