**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی**
سال پنجم، شماره سوم، پیاپی نوزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۵۹-۵۱)

# اثر سطوح مختلف لاکتوباسلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و جمعیت باکتریایی روده ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*)

**فرزانه وکیلی[۱]، فرید فیروزبخش[۲*]، سکینه یگانه[۳]**
۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
۲. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰)

**چکیده**
این مطالعه با هدف ارزیابی تاثیر سطوح مختلف باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) به عنوان مکمل غذایی بر میزان رشد، بازماندگی، فراسنجه‌های خونی و فلور باکتریای روده ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) انجام پذیرفت. به همین منظور ۱۸۰۰ لارو ماهی گوپی با میانگین وزن ۷ میلی‌گرم در ۴ گروه با ۳ تکرار شامل جیره غذایی فاقد باکتری به عنوان شاهد (گروه ۱) و جیره های دارای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در سه سطح $۱/۵\times۱۰^{۷}$ (گروه ۲)، $۳\times۱۰^{۷}$ (گروه ۳) و $۶\times۱۰^{۷}$ (گروه ۴) واحد کلنی بر گرم غذا به مدت ۱۶ هفته تغذیه شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که از نظر افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه بین گروه ۴ و گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایش اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) وجود دارد. بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در گروه ۴ (۹/۷±۰/۱) مشاهده شد که با گروه شاهد (۵/۹۶±۰/۲) اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس روده ماهیان در گروه ۴ مشاهده شد که با گروه شاهد و سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. نتایج نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به مقدار $۶\times۱۰^{۷}$ واحد کلنی بر گرم غذا اثر معنی‌داری بر رشد، تعداد گلبول‌های سفید و جمعیت باکتریایی روده ماهی گوپی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ماهی گوپی، رشد، خون شناسی، جمعیت باکتریایی روده.

* نویسنده مسئول: فرید فیروزبخش E-mail: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

# Effect of different level of *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, hematological parameters and intestinal microbiota in *Poecilia reticulata*

**Farzaneh Vakili[1], Farid Firouzbakhsh[2*], Sekineh Yeganeh[3]**
1. Former M.Sc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Associated Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Associtated Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Jan. 6, 2016 - Accepted: Feb. 18, 2017)

## Abstract
The present study was performed to investigate the effects of various levels of dietary *lactobacillus acidophilus* as feed supplement on the growth performance, survival rate, hematological parameters and intestinal microbiota of guppy (*Poecilia reticulata*). For this purpose one-thousand and eight hundred guppy larvae with 7 mg mean weight in a completely randomized design with 4 treatments and 3 replicates of *L. acidophilus* in the diet, including no bacteria (control), $1.5\times10^7$, $3\times10^7$, $6\times10^7$ CFU $g^{-1}$($T_2$,$T_3$,$T_4$ respectively) were considered and fed for 16 weeks. The results showed that significant differences (P<0.05) in weight gain, FCR and SGR were found between $T_4$ and control group. The highest amount of white blood cell count (9.70±0.1) was observed in 4 group and had significant different (P>0.05) with control (5.96±0.2). The highest amount of intestinal of *Lactobacillus* was observed in 4 group compared to other groups and control (P<0.05). The present study results suggested that *L. acidophilus* ($6\times10^7$ CFU $g^{-1}$) have significant effect on growth and white blood cell count of guppy.

**Keywords:** *Lactobacillus acidophilus*, Guppy, growth, hematology, intestinal microbiota.

مقدمه

ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) از خانواده پوئسیلیده (*Poeciliidae*) بومی آمریکای مرکزی و شمال آمریکای جنوبی است (Firouzbakhsh & Aliasghari 2011). این ماهی در سال ۱۹۴۰ به آب‌های کلمبیا و چند کشور گرمسیری دیگر برای کنترل بیولوژیکی لارو حشراتی که ناقل بیماری‌های عفونی (مانند مالاریا) بودند، معرفی شد. ماهیان زینتی زنده‌زا در بین طرفداران و پرورش دهندگان به دلیل رنگهای درخشان، پذیرفتن انواع خوراک و تولید نوزاد ماهی به تعداد زیاد محبوب‌ترین ماهیان زینتی هستند (Gosh *et al*., 2008).

پروبیوتیک برای مدت زیادی است که در آبزی‌پروری استفاده می‌شود اما در سال‌های اخیر برای افزایش رشد و مقاومت در برابر بیماری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این راهکار مزیت‌های بی‌شمار برای فائق آمدن بر محدودیت‌ها و اثرات زیان‌آور آنتی‌بیوتیک و داروهای دیگر دارد و همچنین با افزایش رشد و مقاومت در برابر بیماری منجر به افزایش در تولید می‌شود (Das *et al*., 2008; Sahu *et al*., 2008).

در صنعت ماهیان زینتی دو اصل مهم یعنی سلامت و تغذیه ماهیان تعیین‌کننده تجارت و موفقیت است. عدم استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی برای افزایش سطح سلامتی و تغذیه منجر به مقاومت دارویی در برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شود. مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها می‌تواند از طریق رقابت برای دریافت مواد مغذی، جایگاه‌های اتصال، تغییر متابولیسم باکتری‌ها یا تحریک سیستم ایمنی بدن مانع تشکیل کلنی باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش میزبان گردد (Nayak, 2010). باکتری‌های پروبیوتیکی باعث افزایش کارائی هضم برای ترکیبات پروتئینی و چربی‌ها موجود در جیره می‌شود و نرخ جذب در بدن میزبان را بالا می‌برد (Gosh *et al*., 2008).

همچنین با افزایش جذب اسیدهای چرب می‌تواند روند زرده‌سازی تخمک‌ها را افزایش دهد و بلوغ اووسیت را تسهیل نماید (Dahlgren, 1980).

از آنجایی‌که اهمیت اقتصادی ماهیان آکواریومی کمتر از ماهیان خوراکی نیست، بنابراین تحقیق و مطالعه در تمام زمینه‌های پرورش از جمله رشد، میزان بقاء و همچنین افزایش میزان مقاومت در برابر بیماری اهمیت دارد. لذا هدف از این تحقیق استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی ماهی گوپی و بررسی عملکرد رشد، تغییرات فراسنجه‌های خونی و فلور میکروبی روده ماهی گوپی است.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی باکتری

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مورد استفاده در این بررسی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با کد QA/G/751/01/02 تهیه شد. نمونه باکتریایی مورد نظر در محیط کشت MRS به‌صورت خطی کشت داده شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C نگهداری شد. پس از مشاهده رشد باکتری، مقداری از باکتری‌ها به داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰cc محیط کشت مایع تزریق شد و پس از یکنواخت شدن به‌وسیله شیکر مجددا داخل انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس بر مبنای نیم مک فارلند به‌وسیله اسپکتوفتومتر غلظت محیط کشت در طول موج ۶۰۰nm اندازه گیری شد و محیط کشت حاوی باکتری با غلظت‌های صفر (شاهد)، $۱/۵×۱۰^{۷}$ CFU/g، $۳×۱۰^{۷}$ CFU/g، $۶×۱۰^{۷}$ به‌ترتیب برای تیمار ۱، ۲، ۳ و ۴ آماده‌سازی شد.

### آماده سازی تیمارها

این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شرکت گرگان ماهی در کیلومتر ۷ جاده گرگان به

شصت‌کلا انجام شد. تعداد ۱۸۰۰ قطعه ماهی گوپی (*P. reticulate*) یک‌روزه با میانگین وزن ۷ میلی‌گرم از حوضچه مولدین گوپی به نسبت ۵ ماده به یک نر جمع‌آوری و به داخل آکواریوم انتقال داده شدند. آب مورد نیاز آکواریوم‌ها از یک حلقه چاه تأمین شد. دمای آب آکواریوم‌ها ۲۶±۰/۲۲°C، اسیدیته ۷/۸±۰/۱، اکسیژن محلول ۸/۷±۰/۶۶ میلی‌گرم بر لیتر اندازه گیری شد.

بچه ماهیان یکروزه گوپی به‌طور تصادفی در۱۲ آکواریوم (هر آکواریوم ۱۵۰ قطعه بچه ماهی) به ابعاد ۳۰×۶۰×۱۰۰ سانتی‌متر با ۱۵۰ لیتر آب تقسیم شدند. بچه‌ماهیان در سه روز اول فقط با ناپلی آرتمیا و پس از آن از غذای دستی (جدول ۱) به مدت ۱۶ هفته تغذیه شدند. غذادهی به ماهیان روزانه ۳ نوبت (۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۳ بعدازظهر) با جیره‌های دارای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان صفر (گروه ۱)، $۱/۵\times۱۰^{۷}$ CFU/g (گروه ۲)، $۳\times۱۰^{۷}$ CFU/g (گروه ۳) و $۶\times۱۰^{۷}$ CFU/g (گروه ۴) انجام شد. برای گروه ۱ (شاهد) از محیط کشت مایع بدون باکتری استفاده شد و به جیره اضافه گردید. آماده سازی غذا هر دو هفته انجام شد و در ظروف در بسته در دمای ۴°C نگهداری شد.

**جدول۱.** ترکیب جیره غذایی پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان گوپی (درصد)

| ترکیب جیره | آرد سویا | آرد ذرت | آرد گندم | آرد جو | پودر ماهی | مکمل | ویتامین* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| درصد | ۲۵ | ۳۶ | ۱۵ | ۱۵ | ۷ | ۱ | ۱ |

* هر ۱۰۰ گرم پرمیکس ویتامین حاوی ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینA، ۳۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۵ گرم تیامین، ۵ گرم ریبوفلاوین، ۶ گرم نیاسن، ۴ گرم پیریدوکسین، ۱ گرم اسید فولیک، ۴ میلی‌گرم سیانو کوبال آمین، ۳۰ گرم ویتامینC، ۳ گرم ویتامین K، ۹ گرم توکوفرول.

**عملکرد رشد**

برای محاسبه شاخص‌های رشد از روابط زیر استفاده شد.

۱) افزایش وزن بدن

= افزایش وزن بدن بر حسب گرم

وزن ابتدایی به گرم − وزن نهایی به گرم

۲) ضریب رشد ویژه (SGR)[1]

$$SGR = \{(Lnw_2 - Lnw_1)/(\text{تعداد روزهای پرورش})\} \times ۱۰۰$$

که در آن:

Ln = Ln w2 میانگین وزن ثانویه به گرم و Ln = w1 میانگین وزن اولیه به گرم می‌باشد.

۳) ضریب تبدیل غذایی (FCR)[2]

ضریب تبدیل غذایی عبارت است از نسبت غذای خورده شده به مقدار افزایش وزن حاصله.

= ضریب تبدیل غذایی

مقدار غذای خورده شده به گرم / مقدار افزایش وزن بدن به گرم

۴) شاخص وضعیت (CF)[3]

نسبت وزن ماهی به طول آن که به‌صورت شاخص وضعیت نشان داده می‌شود، که نشان‌دهنده چگونگی وزن ماهی در ارتباط با طول آن بوده و عاملی است که برای کنترل و بررسی میزان رشد ماهی با تعیین مقدار غذایی که باید در کارگاه به آن داده شود به کار می‌رود.

1. Specific Growth Rate

2. Food Conversion Ratio

3. Condition Factor

$$CF = \frac{W \times 100}{L^3}$$

W = وزن به گرم

L = طول به سانتی‌متر (طول چنگالی)

۵) درصد بازماندگی (SR)[1]

جهت بررسی نرخ بقاء از ابتدای دوره تا انتهای آن تلفات به‌طور روزانه ثبت و در انتها درصد تلفات در تیمارهای مختلف با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

نرخ بقاء =

(تعداد ماهی ابتدایی) / (تعداد ماهی مرده– تعداد ماهی ابتدایی) × ۱۰۰

**پارامترهای خون‌شناسی**

در انتهای دوره پرورش از هر تکرار ۳۰ قطعه ماهی به‌طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با پودر گل میخک به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر (Hoseinifar *et al*. 2015) به روش قطع ساقه دمی خونگیری انجام شد. شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با محلول رقیق کننده نات و هریک به‌وسیله لام هموسیتومتر نئوبار بر حسب میلی‌متر مکعب محاسبه شد. برای شمارش افتراقی انواع گلبول‌های سفید، پس از تهیه گسترش از خون، با متانل با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد تثبیت و با گیمسا رنگ‌آمیزی شد (رنگ گیمسا با رقت ۱/۱۰ تهیه شده از استوک به‌مدت ۱۵ دقیقه) و پس از خشک کردن یک قطره روغن سدر روی گستره ریخته و با عدسی ۱۰۰، صد عدد گلبول سفید را به تفکیک، شمارش و برحسب درصد گزارش گردید (Bullis, 1993).

**آزمایش باکتریایی**

به‌منظور بررسی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روده ماهی گوپی تغذیه شده با سطوح مختلف این باکتری در انتهای دوره آزمایش روده ۱۰ عدد ماهی از هر تیمار برداشت شد و برای شمارش کلی باکتری‌ها به محیط کشت پلیت کانت آگار[2] برای شمارش کلی لاکتوباسیلوس‌ها، به محیط کشت حاوی MRS منتقل و به‌مدت ۵ شبانه‌روز در دمای ۲۵°C–۲۳ نگهداری شدند. سپس کلنی باکتری‌ها به‌وسیله دستگاه کلنی کانتر شمارش جمعیت باکتریایی روده بر اساس CFU/g تعیین شد (Akrami *et al*., 2009).

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. برای تجزیه تحلیل آماری داده‌ها نیز از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن با سطح اطمینان P<۰/۰۵ تعیین گردید. تجزیه و تحلیل به‌وسیله نرم افزار SPSS 17 انجام پذیرفت.

## نتایج

نتایج عملکرد رشد ماهیان گوپی در جدول ۲ نشان می‌دهد که بین تیمار ۴ (۶×۱۰$^{۷}$ CFU/g) با گروه شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی از نظر وزن نهایی، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (P<۰/۰۵). در حالی‌که بین سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری یافت نشد.

نتایج درصد بازماندگی نشان می‌دهد که با افزایش تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی درصد بقا افزایش می‌یابد هرچند که در مقایسه آماری افزایش بازماندگی بین تیمارها با گروه شاهد فقط تیمار ۴ (۶×۱۰$^{۷}$ CFU/g) اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه شاهد نشان داده است و سایر تیمارها علی‌رغم افزایش درصد بازماندگی، اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشته‌اند.

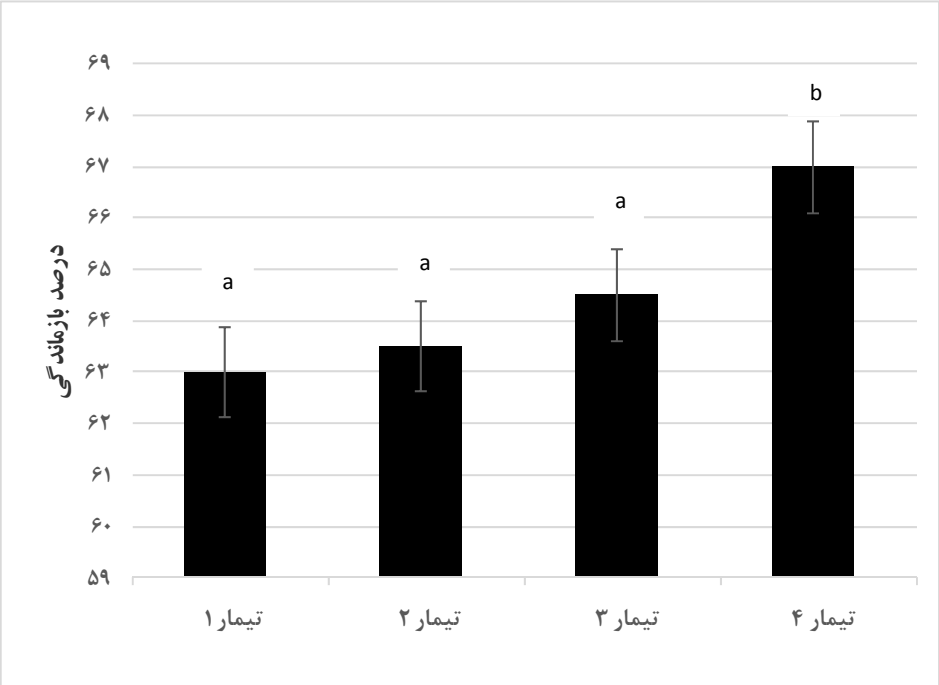
1. Survival Rate

2. Plate Count Agar

**جدول۲.** تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فاکتورهای رشد ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذادهی

| تیمارهای آزمایشی | تیمار ۱ (شاهد) | تیمار ۲ ۱/۵×۱۰^۷CFU/g | تیمار۳ ۳× ۱۰^۷CFU/g | تیمار۴ ۶×۱۰^۷ CFU/g |
|---|---|---|---|---|
| وزن اولیه (میلی‌گرم) | ۷/۱ ±۰/۹۵ | ۷ ±۰/۹۲ | ۷/۱ ±۰/۹۶ | ۷ ±۰/۹۸ |
| وزن نهایی (میلی‌گرم) | ۲۴۶ ±۵۰^b | ۲۴۵ ± ۵۶^b | ۲۵۱± ۵۲^b | ۳۰۹ ±۵۰^a |
| طول نهایی (سانتی‌متر) | ۲/۷±۰/۲^b | ۲/۸ ± ۰/۲^b | ۲/۸±۰/۲^b | ۳/۱ ± ۰/۱^a |
| ضریب تبدیل غذایی | ۴/۷۹±۰/۹۸^b | ۴/۸۲±۱/۰۲^b | ۴/۸۶ ±۱/۰۲^b | ۳/۴۷ ±۰/۶۵^a |
| شاخص وضعیت (درصد) | ۱/۰۷±۰/۲۷^a | ۱/۱۹±۰/۳۷^a | ۱/۱۵ ±۰/۲۱^a | ۱/۰۴ ±۰/۳۱^a |
| نرخ رشد ویژه (درصد روز) | ۲/۹۵±۰/۱۶^b | ۲/۹۴± ۰/۱۷^b | ۲/۹۶±۰/۱۵^b | ۳/۱۴± ۰/۱۳^a |

در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
داده‌های فوق به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است.




**شکل۱.** تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر درصد بازماندگی ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذادهی.
تیمار ۱ (شاهد)، تیمار ۲ (۱/۵×۱۰^۷ CFU/g)، تیمار۳ (۳× ۱۰^۷CFU/g)، تیمار۴ (۶×۱۰^۷ CFU/g)

نتایج فراسنجه‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، درصد نوتروفیل، لنفوسیت و ائوزینوفیل در انتهای دوره پس از تغذیه با جیره حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک در جدول ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شده است که با تیمار ۲ و شاهد اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارند. بیشترین تعداد گلبول‌های قرمز نیز در تیمار ۴ مشاهده شده است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارد.

نتایج شمارش کلی باکتری‌ها در محیط کشت پلیت کانت آگار نشان داد تعداد کل باکتری‌های روده در هفته شانزدهم اختلاف معنی‌داری در مقایسه بین گروه شاهد با دیگر گروه‌ها دارد. همچنین در بین تیمارهای حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). از نظر تعداد

کل لاکتوباسیلوس در هفته شانزدهم اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین گروه شاهد و دیگر تیمارها به‌دست آمد. بر اساس جدول شماره ۶ با افزایش تعداد باکتریای جیره جمعیت باکترایی روده نیز افزایش یافته است.

**جدول ۳.** تأثیر سطوح مختلف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر فاکتورهای خونی ماهی گوپی در ۱۶ هفته غذادهی

| تیمارهای آزمایشی | تیمار ۱ (شاهد) | تیمار ۲ ۱/۵×۱۰^۷CFU/g | تیمار۳ ۳× ۱۰^۷CFU/g | تیمار۴ ۶×۱۰^۷ CFU/g |
|---|---|---|---|---|
| گلبول سفید (۱۰^۳میلیمتر مکعب) | ۵/۹۶۶±۰/۲^c | ۶/۷۳۳±۰/۲۵^b | ۹/۴۳۳±۰/۲۵^a | ۹/۷±۰/۱^a |
| گلبول قرمز (۱۰^۶میلیمتر مکعب) | ۰/۸۷۳±۰/۰۰۲^c | ۰/۸۷۴±۰/۰۰۲۶^c | ۰/۹۲۴۱ ±۰^b | ۰/۹۳۹۳±۰/۱^a |
| نوتروفیل (درصد) | ۶/۶ ±۰/۵^b | ۸±۰/۱^ab | ۹/۴ ±۰/۲^a | ۹/۴ ±۰/۶^a |
| لنفوسیت (درصد) | ۹۲/۶±۰/۵^a | ۹۱/۴±۱^a | ۹۰/۳±۱^a | ۹۰/۳±۱^a |
| ائوزینوفیل (درصد) | ۰/۳±۰/۵^a | ۰/۶±۰/۲^a | ۰/۳± ۰/۵^a | ۰/۳±۰/۵^a |

در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
داده‌های فوق به‌صورت Mean± SD نشان داده شده است.

**جدول ۴.** شمارش کلی باکتری‌ها و تعداد لاکتوباسیلوس‌ها در تیمارهای مختلف ماهی گوپی تغذیه شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ۱۶ هفته

| تیمارهای آزمایشی | تیمار۱ (شاهد) | تیمار ۲ ۱/۵×۱۰^۷CFU/g | تیمار۳ ۳× ۱۰^۷CFU/g | تیمار۴ ۶×۱۰^۷ CFU/g |
|---|---|---|---|---|
| شمارش کلی میکروبی CFU/g | ۹×۱۰^۶ d | ۱/۲×۱۰^۷ c | ۳×۱۰^۷ b | ۶/۴×۱۰^۷ a |
| تعداد لاکتوباسیلوس CFU/g | ۵/۵× ۱۰^۲ d | ۲× ۱۰^۵ c | ۳×۱۰^۵ b | ۱۰^۶ a |

در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
داده‌های فوق به‌صورت Mean± SD نشان داده شده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر در آبزی‌پروری پروبیوتیک در جیره به‌عنوان افزایش‌دهنده رشد و بهبوددهنده محیط پرورش شناخته شده است (Al-dohali *et al*., 2009). افزایش رشد در ماهی همانطور که Fuller (1989) گزارش کرده است ممکن است به دلیل بهینه‌سازی تعادل فلور میکروبی روده توسط باکتری‌های پروبیوتیکی باشد. باکتری‌های پروبیوتیکی در هضم و جذب ترکیبات غذایی غیرقابل هضم و تخریب ترکیبات ضد تغذیه‌ای بویژه الیگوساکاریدها مؤثر هستند و همچنین با تحریک تولید ترکیبات ضروری غذا از جمله ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و آنزیم‌ها مانند آمیلاز و پروتئاز سبب بهبود هضم و جذب غذا در نتیجه رشد بهتر میزبان می‌گردند (Gatesoupe *et al*., 1999). باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس قادر به ترشح رنج وسیعی از اگزوآنزیم‌ها هستند که به جذب غذایی کمک می‌کنند. محققان گزارش کردند فعالیت آنزیمی ماهیان با افزودن مکمل پروبیوتیکی به جیره غذایی افزایش می‌یابد (Suzer *et al*., 2008; Tovar *et al*., 2004; Yanbo & Zirong, 2006).

Carnevali *et al.* (2006) گزارش کردند که میزان رشد در ماهی سی‌بس (*Dicentrarchus labrax*) جوان در تیمارهای تغذیه شده با روتیفر و آرتمیای غنی‌شده با باکتری لاکتوباسیلوس دلبراکی (*Lactobacillus delbrueckii*) اختلاف معنی‌داری داشتند (Carnevali *et al*., 2006). در مطالعه حاضر نیز افزودن باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به غذای ماهی گوپی، افزایش رشد آنها را به همراه داشت.

Gosh *et al.* (2008) گزارش کردند که افزودن باکتری *B. subtelis* متعلق به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک به مقدار CFU/g $۵×۱۰^{۶}$ و $۵×۱۰^{۸}$ به جیره غذایی ماهیان زنده‌زا از جمله گوپی با وزن تقریبی ۱۶۰ میلی‌گرم سبب افزایش نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش بقاء می‌گردد (Gosh *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای که Neissi *et al.* (2013) انجام دادند باکتری پدیوکوکوس (*Pediococcous*) را با غلظت CFU/g $۰/۹×۱۰^{۷}$ به جیره غذایی ماهی گرین ترور افزودند و در انتهای دوره آزمایشی افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی را مشاهده کردند (Neissi *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر نیز همانند نتایج این محققان افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به میزان CFU/g $۶×۱۰^{۷}$ در جیره غذایی ماهیان گوپی نرخ رشد ویژه را افزایش و ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد.

همانطور که Rollo *et al.* (2006) در ماهی سی بریم (*Sparus aurata*) گزارش کردند، افزایش درصد بازماندگی در تیمار پروبیوتیکی می‌تواند به علت افزایش افزایش مقاومت ماهیان در برابر شرایط نامطلوب باشد که ممکن است در طول دوره پرورش در محیط پرورش به‌وجود آید (Rollo *et al.*, 2006). همچنین افزایش بازماندگی ناشی از مصرف باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در در گربه ماهی (Hybrid Catfish Heteroclarias) (Yisa *et al.*, 2015) و تیلاپیای نیل (Villamil *et al.*, 2014) هم گزارش شده است. در تحقیق حاضر نیز بیشترین و کمترین درصد بازماندگی ماهی گوپی به ترتیب در گروه ۴ و شاهد مشاهده شد که حکایت از تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر درصد بازماندگی ماهیان دارد.

در این آزمایش شمارش سلول‌های خونی در تیمارهای پروبیوتیکی و تیمار شاهد به خوبی نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی فاکتورهای خونی تأثیر مثبت داشته است. به‌طوریکه تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در گروهای تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نشان داده است. این نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش پروبیوتیک سلامت و سطح ایمنی بدن ماهی افزایش یافته است (Ranzani-Paiva *et al.*, 2000; Irianto & Austin, 2002).

افزایش تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ممکن است بدلیل افزایش پاسخ سیستم ایمنی رخ داده باشد (Panigrahi *et al.*, 2005). در آزمایشی که Al-Dohail *et al.* (2009) بر روی گربه ماهی آفریقایی انگشت قد انجام دادند در تیمارهایی که با باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با مقدار $۳×۱۰^{۷}$ تغذیه شده بودند غلظت گلبول‌های قرمز و سفید نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. افزایش میزان گلبول‌های قرمز که در نتیجه اضافه کردن پروبیوتیک به جیره به‌وجود می‌آید در نهایت موجب افزایش انتقال اکسیژن در خون می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز موجود در هموگلوبین موجب افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک می‌شود و در نتیجه برای بافتی که اکسیژن زیادی نیاز دارد اکسیژن بیشتری فراهم می‌شود (Firouzbakhsh *et al.*, 2011). در آزمایشی که در سال ۲۰۰۲ انجام شد محققان دریافتند که استفاده از پروبیوتیک می‌تواند باعث افزایش RBC، WBC و به‌ویژه درصد لنفوسیت‌ها شود (Irianto & Austin, 2002). در تحقیق حاضر نیز با افزایش میزان پروبیوتیک جیره، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز و سفید مشاهده شد.

پروبیوتیک‌ها سلول‌های میکروبی زنده‌ای هستند که با تغییر فلور میکروبی روده باعث افزایش سطح سلامتی میزبان می‌شوند (Fuller, 1989). افزایش تعداد لاکتوباسیلوس در تیمارهای تغذیه‌شده با این پروبیوتیک نشان می‌دهد که دستگاه گوارش ماهی گوپی محیط مناسبی برای افزایش و ازدیاد

لاکتوباسیلوس است که این افزایش در نهایت منجر به افزایش رشد، افزایش در تعداد سلول‌های خونی در این ماهی شده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می توان پیشنهاد کرد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس اثرات پروبیوتیکی در ماهی گوپی داشته لذا می‌توان از این باکتری برای افزایش رشد و بازماندگی گوپی به‌ویژه در اوایل دوره رشد استفاده کرد.

## REFERENCES


1. Akrami, R.; Hajimoradloo, A.; Matinfar, A.; Abedian Kenari, A. (2009). Effect of Dietary Prebiotic Inulin on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body Composition and Hematological Parameters of Juvenile Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Journal of the World Aquaculture Society, 6: 771-779.
2. Al-Dohail, M.A.; Hashim, R.; Aliyu-Paiko, M.; (2009). Effects of the probiotic, Lactobacillus acidophilus, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus, Burchell1822*) fingerling. Aquaculture Research, 40: 1642-1652.
3. Bullis, R.A.; (1993). Clinical pathology of temperate freshwater and estuarine fishes. In: stoskopf MK (ed) fish medicine. W.B. Sanders Co., Philadelphia, 232-239.
4. Carnevali, O.; Vivo, L.; Sulpizio, R.; Gioacchini, G.I.; Olivotto, I.; Silvi, S.; Cresci, A.; (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture; 258: 430- 438.
5. Dahlgren, B.T.; (1980). The effects of three different dietary protein levels on the fecundity in the guppy (*Poecilia reticulate Peters*). Journal of Fish Biology, 16: 83-97.
6. Das, S.; Ward, L.R.; Burke, C.; (2008). Prospects of using marine Actinobacteria as probioticsin aquaculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 81: 419-429.
7. Firouzbakhsh, F.; Aliasghari, M.; (2011). An illustrated encyclopedia of freshwater aquarium fish. 2rd ed. Tehran, Patove Vagheh. P 157.
8. Firouzbakhsh, F.; Noori, F.; Khalesi, M.K.; Jani-khalili, K.; (2011). Effect of a probiotic**,** protexin, on growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotuso cellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry; 37: 833-842.
9. Fuller, R.; (1989). Probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology; 66: 365-378.
10. Gatesoupe, F.J.; (1999). The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture; 180: 147-165.
11. Gosh, S.; Sinha, A.; Sahu, C.; (2008). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. Aquaculture Nutrition; 14: 289-299.
12. Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A.; Vakili, F.; (2015). The effects of Lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & shellfish immunology; 42(2): 533-538.
13. Irianto, A.; Austine, B.; (2002). Probiotic in aquaculture. Journal of Fish Disease; 25: 633-642.
14. Nayak, S. K.; (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and Shellfish Immunology; 29: 2-14.
15. Neissi, A.; Rafiee, G.; Nematollahi, M.; Safari, O.; (2013). The effect of Pediococcous acidlactici bacteria used as probiotic supplement on the growth

and non-specific immune responses of green terror, Aequidens rivulatus. Fish and Shellfish Immunology; 35: 1976-1980.

16. Panigrahi, A.; Kiron, J.; Puangkaew, T.; Kobayashi, S.; Sugita, H.; (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture; 243: 24 1-254.
17. Ranzani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; das Eiras, A.A.; Felizardo, N.N.; (2000). Haemotological analysis of 'chara' *Pseudoplatystoma fasciatum* in captivity.Aqua Responsible aquaculture in the new millennium, Nice, France, European Aquaculture Society special publication 28, 590pp.
18. Rollo, A.; Sulpizio, R.; Nardi, M.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Caggiano, M.; Cresci, A.; Carnevali, O.; (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. Fish Physiology and Biochemistry; 32: 167-177.
19. Sahu, M.K.; Swarnakumar, N.S.; Sivakumar, K.; Thangaradjou, T.; Kannan, L.; (2008). Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. Indian Journal of Microbiology; 12: 1-10.
20. Suzer C.; Coban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuogfllu, O.; Kucuksari, H.; (2008). Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture; 280: 140-145.
21. Tovar, D.; Zambonino, I.J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; -Juarez, R.; (2004). Infuence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. Aquaculture; 234: 415-427.
22. Villamil, L.; Reyes, C.; Martínez-Silva, M. A.; (2014). In vivo and in vitro assessment of Lactobacillus acidophilus as probiotic for tilapia (Oreochromis niloticus, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. Aquaculture Research; 45(7): 1116-1125.
23. Yanbo, W.; Zirong, X.; (2006). Effect ofprobiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance anddigestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology; 127: 283-292.
24. Yisa, T. A.; Ibrahim, O. A.; Tsadu, S. M.; Yakubu, U. P.; (2015). Effect of Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) as Immune Stimulant on Hybrid Catfish Heteroclarias. British Microbiology Research Journal; 9(1): 1-6.