

اثر افزودن مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (دی پرو آکوا™) به جیره غذایی بر برخی شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

چکیده

در این تحقیق اثرات یک مخلوط تجاری پروبیوتیک شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis* بر برخی شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی در مجتمع فرهنگی کشاورزی شهید مهران زاده استان خوزستان به مدت ۶۰ روز مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمایش در سه تیمار شامل ۰/۵ (تیمار اول)، ۰/۷ (تیمار دوم) و ۰/۹ (تیمار سوم) گرم مخلوط پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم جیره و یک گروه شاهد (فاقد پروبیوتیک) طراحی شد. هر یک از تیمارها با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۳۵ قطعه ماهی کپور معمولی (100 ± 10 گرم وزن اولیه) با تراکم ۱۰/۵۰ کیلوگرم در مترمکعب بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده پارامترهای رشد شامل وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، نسبت کارایی پروتئین و نرخ کارایی تغذیه به‌طور معنی‌داری در تیمار سوم نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت ($P < 0.05$). کمترین ضریب تبدیل غذایی (۱/۷۴) در تیمار سوم مشاهده شد ($P < 0.05$). نتایج حاکی از بیشتر بودن غلظت هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز و سطح لایزوزیم (۱۲۹/۳۳ میکروگرم در لیتر) در تیمار سوم نسبت به سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مخلوط پروبیوتیک به میزان ۰/۹ گرم در هر کیلوگرم غذا باعث بهبود رشد و تقویت سیستم ایمنی ماهی شده و افزودن آن در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: *Bacillus subtilis*، *Bacillus licheniformis*، ماهی کپور معمولی، رشد، ایمنی، پروبیوتیک.

مقدمه

در آبی‌پروری هزینه غذا به‌طور معمول ۳۰ تا ۶۰ درصد از کل هزینه لازم برای سیستم‌های پرورش ماهی را به خود اختصاص داده که در نتیجه در سال‌های اخیر استفاده از مواد افزودنی در اصلاح خوراک آبزیان به‌شدت مورد توجه واقع شده است. یکی از مهم‌ترین این افزودنی‌ها،

میلاذ خالقی^۱

مهدی سلطانی^{۲*}

سیدپژمان حسینی شکرابی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات:

msoltani@ut.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۲۰۶۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲

مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی

ارشد است.

محصولات میکروبی است که به‌طور مستقیم همراه با جیره به مصرف می‌رسد و در تجارت به نام پروبیوتیک (ریشه کلمه یونانی پروبیوس) و در لغت به معنی زیست‌یار شناخته می‌شود.

به‌طور کلی پروبیوتیک‌ها در آبی پروری برای اهداف بسیاری از جمله رشد اقتصادی، بهبود فلور طبیعی روده، ارتقاء هضم و جذب، پیشگیری و یا سرکوب بیماری‌های عفونی در خوراک آبزیان استفاده می‌شوند (Irianto and Austin, 2002; Nayak, 2010). یک پروبیوتیک به‌منظور داشتن حداکثر تأثیر و فعالیت مطلوب باید گونه، سویه و غلظت آن در جیره غذایی مصرفی در نظر گرفته‌شده و همچنین نباید بیماری‌زا و یا مسمومیت‌زا باشند (Gatesoupe, 1999; Soltani et al., 2017).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از خانواده کپور ماهیان که منشأ آسیایی داشته در اکثر آب‌های شیرین نیمه گرمسیری تا گرمسیری سراسر جهان پراکنش داشته و به‌صورت اقتصادی پرورش داده می‌شوند (Guler et al., 2008). این گونه در ایران نیز جزء یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی گرمابی بوده و سالیانه مقادیر عظیمی از این ماهیان در استخرهای پرورشی (بتونی و یا خاکی)، آب‌بندها و آبگیرهای طبیعی تولید و برای مصرف مردم به بازار عرضه می‌گردد. طبق آخرین سالنامه آماری کپور معمولی با تولید بیش از ۴/۳۰۰ میلیون تن رتبه سوم را در بین آبزیان پرورشی در جهان به خود اختصاص داده (FAO, 2017) و در ایران تولید ماهیان گرمابی بالغ بر ۱۷۰ هزار تن گزارش‌شده است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳). بنابراین اصلاح و یا بهبود جیره غذایی این آبی پرورشی در جهت افزایش راندمان رشد و ایمنی بیش‌ازپیش اهمیت پیدا می‌کند.

امروزه استفاده از باکتری‌های انتخابی به‌صورت ترکیبی به جهت پوشش اثرات هم‌افزایی آن‌ها در رشد و بهبود مناسب جمعیت میکروبی میزبان از جمله ایده‌های جدید در آبی پروری بوده که در همین راستا می‌توان تلفیق برخی از میکرو ارگانیسم‌ها مانند: باکتری‌های اسیدلاکتیک، باسیل‌ها و مخمرها را نام برد (Ringo and Birkbeck, 1999) از بین این گونه‌ها، باسیلوس‌ها مثل گونه *Bacillus subtilis* دارای اهمیت خاصی بوده، بطوریکه به دلیل داشتن اسپور به‌راحتی می‌توانند شرایط سخت محیطی را تحمل کرده و رشد به نسبت بالایی داشته و قابلیت تولید آنزیم دارد که بسته به سویه‌های مختلف مقدار اثر هریک این خواص می‌تواند متفاوت باشد (Newaj-Fyzul et al., 2014). مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها به‌طور کامل مشخص نشده اما اثبات‌شده باسیلوس‌ها همچنین قابلیت ضد میکروبی از طریق‌های دفع رقابتی پاتوژن‌ها، تولید برخی پپتیدها ضد میکروبی، قطع کردن ارتباط بین سلولی در میان باکتری‌ها و تحریک سیستم ایمنی بدن میزبان می‌شوند (Miranda et al., 2017; Soltani et al., 2015). در همین راستا، Lee و همکاران (۲۰۱۷) مخلوط پروبیوتیک *B. subtilis* و *Lactobacillus plantarum* را روی عملکرد رشد، پارامترهای ایمونولوژیک، مورفولوژی روده و مقاومت به بیماری در مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) ارزیابی نموده و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میانگین وزن و فعالیت‌های آنزیمی غیراختصاصی از جمله لیپوزیم و سوپراکسید دیسموتاز در ماهیان تغذیه‌شده با مخلوط 10^7 CFU در گرم باسیلوس سوبتیلیس و 10^8 CFU در گرم *L. plantarum* به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی گزارش شد. ناصری و همکاران (۱۳۸۹) تأثیر مخلوط باکتری‌های *B. subtilis* و *B. licheniformis* را بر برخی فاکتورهای خونی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند با افزایش مخلوط پروبیوتیکی در جیره، تعداد کل گلبول‌های سفید و ایمونوگلوبولین M افزایش می‌یابد. جعفریان و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند مخلوط پروبیوتیک باسیلوس‌ها با مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر پارامترهای رشد و تغذیه در بچه ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) سبب بهبود عملکرد رشد و تغذیه بچه ماهیان می‌شود. در مطالعه لیائی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که اضافه کردن باکتری *B. subtilis* مستخرج از روده ماهی کپور معمولی به مقدار 10^6 CFU در هر کیلوگرم جیره اثرات مثبتی بر پارامترهای رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای بچه ماهیان کپور دارد.

این مطالعه باهدف افزودن سطوح مختلف یک مخلوط پروبیوتیک تجاری در آبزیان (شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis*) بانام تجاری دی‌پرو آکوا در جیره غذایی بچه ماهی کپور معمولی و ارزیابی برخی فاکتورهای رشد، هماتولوژی و ایمنی طی مدت ۶۰ روز انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت ۶۰ روز در پاییز ۱۳۹۵ در استان خوزستان، شهرستان شوش دانیال، مجتمع فرهنگی کشاورزی شهید مهران زاده انجام شد. بدین منظور تعداد ۴۲۰ عدد ماهی از ماهی کپور معمولی (وزن اولیه 100 ± 15 گرم) تهیه و در ۱۲ مخازن ۳۰۰ لیتری منتقل شدند. تمام تجهیزات پرورش قبل از شروع آزمایش با ماده ضدعفونی بر پایه پراسید استیک (۸۰ قسمت در میلیون) ضدعفونی شدند (Hushangi and Hosseini Shekarabi, 2018). در طول دوره آزمایش درجه حرارت (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن (بالای ۶ قسمت در میلیون)، pH (۷-۷/۹)، نیتريت (کمتر از ۰/۰۵ قسمت در میلیون)، آمونیاک (کمتر از ۰/۰۵ قسمت در میلیون) و سختی آب (کمتر از ۳۰۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم) در تمامی تانک‌ها به‌صورت روزانه به کمک مولتی‌متر پرتابل WTW ۳۲۰ کنترل و ثابت نگهداری شد.

مخلوط پروبیوتیک *B. subtilis* (تعداد باکتری 6×10^{12} cfu در گرم) و *B. licheniformis* (تعداد باکتری 3×10^{12} cfu در گرم) به‌صورت پودر لیوفلیزه بانام تجاری دی‌پرو آکوا از شرکت تک ژن (تهران، ایران) تهیه شد. از خوراک تجاری اکستروود مخصوص ماهی کپور (شرکت فردانه، شهرکرد) به‌عنوان جیره پایه (شاهد) شامل 32 ± 0.5 درصد پروتئین، 5 ± 0.3 درصد چربی، 6 ± 0.3 درصد فیبر، 9 ± 0.4 درصد خاکستر و 8 ± 0.2 درصد رطوبت در این تحقیق استفاده شد (AOAC, 2000). در ابتدا بچه ماهیان با جیره‌های پایه به‌منظور سازگاری تغذیه‌شده و پس از گذشت دو هفته با جیره‌های غذایی پایه مکمل شده با مخلوط پروبیوتیکی تغذیه شدند. بطوری که جیره پایه طبق پیشنهاد شرکت سازنده دی‌پرو آکوا با 0.5 (تیمار ۱)، 0.7 (تیمار ۲) و 0.9 (تیمار ۳) گرم مخلوط پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم خوراک مکمل سازی شد. جهت مکمل سازی جیره پایه، مخلوط پروبیوتیک توسط ترازوی حساس (دقت 0.001 گرم) برای هر تیمار به‌صورت جداگانه وزن شده و با استفاده از روغن مایع گیاهی (روغن آفتابگردان) روی غذای به‌صورت روزانه اسپری شدند. در ضمن جیره شاهد نیز روغن آفتابگردان را بدون مخلوط پروبیوتیکی دریافت کردند. درصد غذادهی با توجه به‌اندازه بچه ماهی‌ها، بیومتری هفتگی و دمای آب ماهیان ۳-۵ درصد از وزن بدن در سه نوبت روزانه در مدت ۶۰ روز انجام شد.

هر دو هفته یک‌بار حدود ۵۰ درصد از ماهیان هر تکرار (۱۵ عدد ماهی) بعد از بیهوشی با اسانس گل میخک (۱۵۰ قسمت در میلیون) به‌صورت تصادفی صید و بیومتری شدند. یک شبانه‌روز قبل از بیومتری غذادهی قطع گردید. تلفات به‌صورت روزانه بررسی و یادداشت شد. وزن ماهیان با ترازو با دقت 0.01 گرم و طول ماهیان نیز با استفاده از خط کش تعیین شدند. فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای شامل: درصد نرخ رشد ویژه (SGR)، درصد فاکتور وضعیت (CF)، درصد ضریب رشد حرارتی (TGC)، درصد رشد روزانه (ADG)، درصد افزایش وزن (RGR)، درصد بقاء (SR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نسبت کارایی انرژی (EER)، نسبت کارایی پروتئین (PER)، نسبت کارایی چربی (LER) و مقدار غذای مصرفی (RFI) با استفاده از معادلات زیر محاسبه گردید (Helland et al., 1996; Hevroy et al., 2005):

$SGR = \frac{\text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی (گرم)} - \text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی (گرم)}}{\text{طول دوره آزمایش (روز)}} \times 100$

$CF = \frac{\text{طول کل ماهی (سانتیمتر)}}{\text{وزن نهایی ماهی (گرم)}} \times 100$

$TGC = \frac{\text{وزن توده زنده اولیه ماهی (گرم)}}{\text{وزن توده زنده ثانویه ماهی (گرم)}} \times 100$

$ADG = \frac{\text{مجموع میانگین درجه حرارت‌های روزانه} \times \text{طول دوره آزمایش (روز)}}{\text{وزن اولیه ماهی (گرم)}} \times 100$

$ADG = \frac{\text{وزن اولیه ماهی (گرم)}}{\text{طول دوره آزمایش (روز)}} \times 100$

$ADG = \frac{\text{وزن اولیه ماهی (گرم)}}{\text{طول دوره آزمایش (روز)}} \times 100$

$$RGR = [\text{وزن اولیه ماهی (گرم)} / \text{وزن اولیه ماهی (گرم)} - \text{وزن نهایی ماهی (گرم)}] \times 100$$

$$SR = 100 \times \text{تعداد ماهی اولیه} / (\text{تعداد ماهی مرده} - \text{تعداد ماهی اولیه})$$

$$FCR = \text{وزن به دست آمده ماهی (گرم)} / \text{غذای خورده شده (گرم)}$$

$$FCE = 100 \times \text{غذای خورده شده (گرم)} / \text{وزن به دست آمده ماهی (گرم)}$$

$$EER = \text{انرژی خورده شده (کیلوژول)} / \text{وزن به دست آمده (گرم)}$$

$$PER = \text{گرم پروتئین خورده شده (گرم)} / \text{وزن به دست آمده (گرم)}$$

$$LER = \text{گرم چربی خورده شده (گرم)} / \text{وزن به دست آمده (گرم)}$$

$$RFI = [(2) \div \text{گرم وزن اولیه} - \text{گرم وزن نهایی}] / \text{غذای خشک خورده شده (گرم)}$$

نمونه برداری و خون گیری بعد از ۶۰ روز از شروع پرورش به منظور بررسی برخی شاخص های خونی و ایمنی انجام شد. بدین منظور جهت جلوگیری از استرس، ۲۴ ساعت قبل از خون گیری، تغذیه ماهیان قطع شد و پس از بیهوشی ماهیان از هر تکرار تعداد ۳ ماهی به صورت تصادفی به روش خون گیری از سیاهرگ دمی انتهای باله مخرجی خون گیری انجام شد. از نمونه خون ماهیان جهت جداسازی سرم مقدار ۱ میلی لیتر در لوله های سرولوژی فاقد ماده ضد انعقاد و جهت جداسازی پلاسما (سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) مقدار ۱ میلی لیتر در ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین تقسیم گردید. بخش دیگری از خون ماهیان فاقد ماده ضد انعقاد پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گیمسا جهت شمارش لوکوسیتی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های سرم در شرایط فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در این مطالعه روش اندازه گیری پارامترهای هماتولوژی به روش توصیه شده Feldman و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. تعداد گلبول های قرمز (RBC) تعداد گلبول های سفید (WBC)، هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb) و همچنین شمارش افتراقی گلبول های سفید نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت و ائوزینوفیل و بازوفیل نیز به روش توصیه شده Borges و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شد.

برای سنجش مقدار لیزوزیم از روش بیان شده توسط Ellis و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد. در این روش در ابتدا ۱۵ میکرو لیتر سرم به پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد الایزا، افزوده گردیده، سپس ۱۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر از بافر استات سدیم ۰/۰۲ مولار با pH برابر ۵/۵) به آن اضافه شد و جذب نوری اولیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق (۲۴ درجه سانتی گراد)، مجدداً جذب نوری اندازه گیری شد. لیزوزیم سفیده تخم مرغ لیوفلیزه شده (سیگما) نیز به منظور ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده ها پس از صحت نرمال بودن داده توسط آزمون کلموگروف-اسمیرنوف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون تکمیلی دانکن انجام شده و وجود یا نبود اختلاف معنی دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید. برای انجام محاسبات فوق از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز پارامترهای رشد ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مقادیر مختلف پروبیوتیک در جدول ۱ خلاصه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان افزایش وزن مربوط به تیمار ۳ (۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) می باشد ($P < 0.05$). بعد از آن تیمار ۲ (۰/۷ گرم پروبیوتیک

در کیلوگرم غذا) با اختلاف جزئی نسبت به تیمار ۱ (۰/۵ گرم در کیلوگرم) دارای رشد بیشتر و در نهایت تیمار شاهد که در جیره آن هیچ‌گونه پروبیوتیک وجود نداشت کمترین رشد در بین تیمارهای آزمایشی را داشت ($P < 0/05$). کمترین میزان نرخ رشد ویژه مربوط به تیمار شاهد با میزان ۱/۰۹ بوده و بیشترین میزان آن مربوط به ماهیان در ماهیان تیمار ۳ تغذیه‌شده با جیره مکمل شده (۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) به دست آمد ($P < 0/05$). تمامی تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد در خصوص فاکتور وضعیت یا یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). در خصوص ضریب رشد حرارتی بیشترین میزان این پارامتر در تیمار ۳ معادل ۰/۸۶ و کمترین میزان آن در تیمار شاهد معادل ۰/۶۴ به دست آمده ($P < 0/05$). بالاترین میانگین رشد روزانه با مقدار ۱/۹۷ متعلق به ماهیان تیمار ۳ تغذیه‌شده با جیره مکمل شده (۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) بود و این تیمار با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). بالاترین و پایین‌ترین درصد بقا در تیمار ۳ و تیمار شاهد به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد به دست آمد.

جدول ۱: پارامترهای رشد ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی ۶۰ روز تغذیه با سطوح مختلف مخلوط پروبیوتیک تجاری دی‌پرو آکوا.

پارامتر	تیمارها			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن ثانویه (گرم)	۱۹۷/۰۳±۱ ^d	۲۱۱/۰۵±۰/۰۵ ^c	۲۱۴/۷±۰/۲ ^b	۲۲۰/۹۵±۰/۰۵ ^a
نرخ رشد ویژه (SGR)	۱/۰۹±۰/۰۱ ^d	۱/۲±۰ ^c	۱/۲۲±۰ ^b	۱/۲۷±۰ ^a
فاکتور وضعیت (CF)	۱/۳۴±۰/۰۱ ^d	۱/۴۴±۰ ^b	۱/۳۸±۰ ^c	۱/۶۳±۰ ^a
ضریب رشد حرارتی (TGC)	۰/۶۴±۰/۰۱ ^d	۰/۷۷±۰ ^c	۰/۸±۰ ^b	۰/۸۶±۰ ^a
میانگین رشد روزانه (ADG)	۱/۵۸±۰/۰۲ ^d	۱/۸۱±۰ ^c	۱/۸۶±۰/۰۱ ^b	۱/۹۷±۰ ^a
نرخ وزن نسبی به دست آمده (RGR)	۱۰۳/۱۳±۱/۰۳ ^d	۱۱۷/۵۸±۰/۰۵ ^c	۱۲۱/۳۴±۰/۲۱ ^b	۱۲۷/۷۸±۰/۰۶ ^a
بقا (درصد)	٪۹۸	٪۹۸	٪۹۹	٪۱۰۰

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($n=15$, $P < 0/05$). جیره شاهد (خوراک تجاری ماهی فاقد افزودنی)، تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب واحد ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیکی دی‌پرو به ازای هر کیلوگرم خوراک پایه بودند.

نتایج آنالیز پارامترهای تغذیه‌ای ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با مقادیر مختلف مخلوط پروبیوتیک در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی که نشانگر بیشترین میزان تأثیر جیره غذایی می‌باشد در ماهیان تیمار ۳ تغذیه‌شده با جیره مکمل شده (۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) معادل ۱/۷۴ به دست آمد و بیشترین میزان این پارامتر در تیمار شاهد معادل ۱/۹۲ بود. تفاوت معنی‌داری بین تمامی تیمارهای آزمایشی مشاهده شد ($P < 0/05$). کمترین میزان کارایی تبدیل غذا در تیمار شاهد که در آن هیچ‌گونه پروبیوتیک جهت مکمل سازی استفاده نشده بود معادل ۵۲/۰۷ به دست آمد و این تیمار تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد ($P < 0/05$). بین نسبت کارایی انرژی به دست آمده تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و کمترین میزان کارایی انرژی در این تیمار مشاهده شد ($P < 0/05$). بهترین نسبت کارایی پروتئین و چربی نیز در ماهیان تیمار ۳ تغذیه‌شده با جیره مکمل شده (۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) به دست آمد و کمترین میزان این دو پارامتر در تیمار شاهد به ترتیب معادل ۱/۴ و ۴/۱۵ به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی در خصوص این دو پارامتر مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین غذای مصرفی ماهیان در تیمار شاهد برابر ۳/۹۹ و کمترین میزان آن در تیمار ۳ برابر ۳/۵۵ به دست آمد و بین تمامی تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری دیده شد ($P < 0/05$).

جدول ۲: پارامترهای تغذیه‌ای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی ۶۰ روز تغذیه با سطوح مخلوط

پروبیوتیک تجاری دی‌پرو اکوا.

تیمارها				پارامتر
تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
۱/۷۴±۰/۰۳ ^d	۱/۷۸±۰/۰۱ ^c	۱/۸±۰/۰۳ ^b	۱/۹۲±۰/۰۱ ^a	ضریب تبدیل غذایی (FCR)
۵۷/۵۴±۰/۰۱ ^a	۵۶/۲۳±۰/۰۵ ^b	۵۵/۴۲±۰/۰۲ ^c	۵۲/۰۷±۰/۰۲۵ ^d	کارایی تبدیل غذا (FCE)
۰/۰۴±۰ ^a	۰/۰۴±۰ ^a	۰/۰۴±۰ ^a	۰/۰۳±۰ ^a	نسبت کارایی انرژی (EER)
۱/۵۵±۰/۰۷ ^a	۱/۵۱±۰/۰۱ ^b	۱/۴۹±۰/۰۶ ^c	۱/۴±۰/۰۱ ^d	نسبت کارایی پروتئین (PER)
۴/۵۸±۰/۰۵ ^a	۴/۴۸±۰/۰۳ ^b	۴/۴۲±۰/۰۱ ^c	۴/۱۵±۰/۰۳ ^d	نسبت کارایی چربی (LER)
۳/۵۵±۰/۰۱ ^d	۳/۸۹±۰/۰۱ ^c	۳/۹۱±۰/۰۴ ^b	۳/۹۹±۰/۰۸ ^a	غذای مصرفی (RFI)

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($n=15$, $P<0/05$). جیره شاهد (خوراک تجاری ماهی فاقد افزودنی)، تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب واجد ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیکی دی‌پرو به ازای هر کیلوگرم خوراک پایه بودند.

نتایج آنالیز فاکتورهای خونی بچه ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با مقادیر مختلف باسیلوس‌های پروبیوتیک در جدول ۳ نشان داده‌شده است. بر طبق نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان هموگلوبین، در تیمار ۳ برابر با ۹/۲۲ گرم بر دسی لیتر به دست آمد ($P<0/05$). در خصوص تعداد گلبول‌های سفید شمارش‌شده هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($P>0/05$). بیشترین میزان هماتوکریت در تیمار ۲ برابر ۴۷/۶۷ درصد و کمترین آن در تیمار شاهد برابر ۳۶/۵ به دست آمد ($P<0/05$). البته این دو تیمار از این لحاظ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($P>0/05$). بیشترین تعداد گلبول‌های قرمز در ماهیان تغذیه‌شده با تیمار ۳ برابر با ۱/۶۶ و کمترین تعداد آن در ماهیان شاهد مشاهده شد ($P<0/05$).

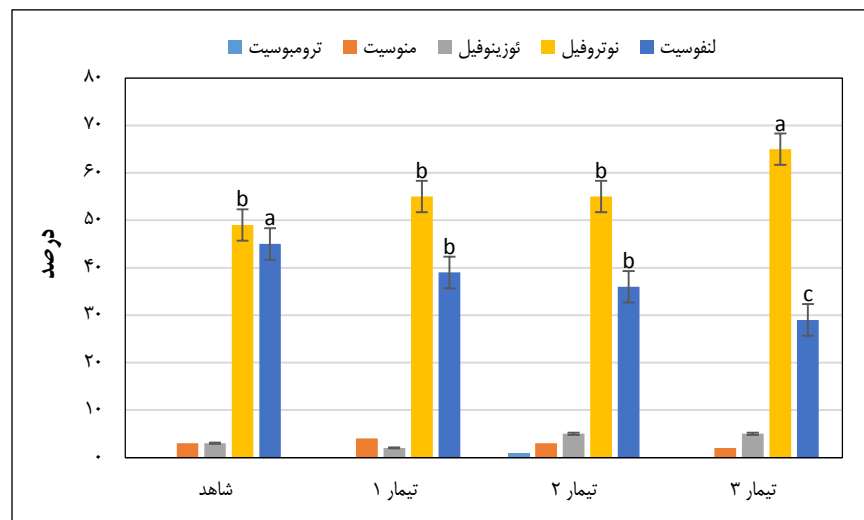
جدول ۳: پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی ۶۰ روز تغذیه با سطوح مخلوط پروبیوتیک

تجاری دی‌پرو اکوا.

تیمارها				فاکتور
تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
۹/۲۲±۱/۲۱ ^a	۸/۵±۰/۵۵ ^a	۸/۱۵±۱/۱۱ ^a	۶/۵۶±۰/۵۵ ^b	HB (g/dl)
۶۸/۱۷±۱۵/۶۸ ^a	۶۷/۸۳±۳۰/۵۱ ^a	۶۳/۳۳±۲۰/۷۳ ^a	۷۱/۸۳±۱۷/۹۹ ^a	WBC (تعداد در میلی‌متر مکعب) ($\times 10^3$)
۴۳/۸۳±۳/۱۸ ^{ab}	۴۷/۶۷±۴/۸۰ ^a	۴۳/۵±۴/۹۳ ^b	۳۶/۵±۱۰/۳۳ ^c	PCV (%)
۱/۶۶±۰/۳۲ ^a	۱/۴۱±۰/۳۱ ^{ab}	۱/۴۵±۰/۴۶ ^{ab}	۱/۱۵±۰/۲۰ ^b	RBC (تعداد در میلی‌متر مکعب) ($\times 10^6$)

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($n=9$, $P<0/05$). جیره شاهد (خوراک تجاری ماهی فاقد افزودنی)، تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب واجد ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیکی دی‌پرو به ازای هر کیلوگرم خوراک پایه بودند.

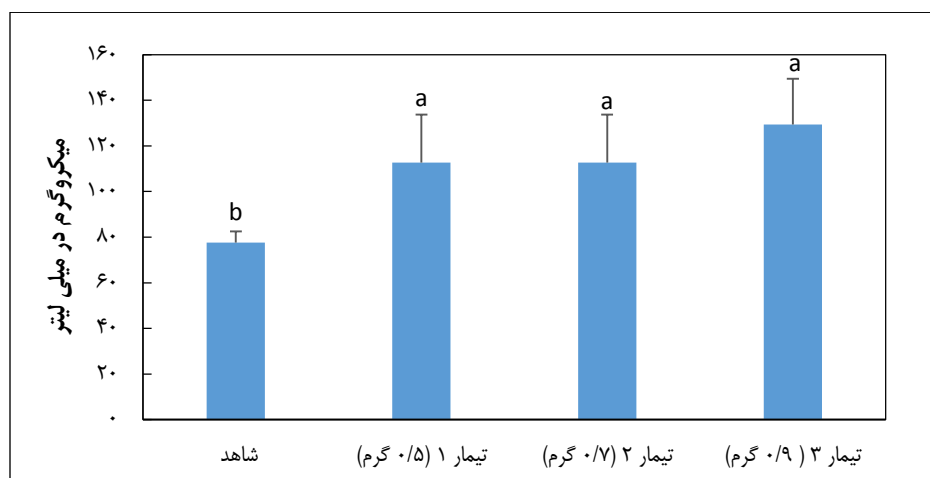
نتایج افتراقی گلبول‌های سفید ماهیان کپور معمولی تغذیه‌شده با مقادیر مختلف باسیلوس‌های پروبیوتیکی در شکل ۱ نشان داده‌شده است. بر طبق نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان نوتروفیل در ماهیان تغذیه‌شده با ۰/۹ گرم از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در کیلوگرم جیره (تیمار ۳) و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). جمعیت سایر گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P>0/05$).



شکل ۱: وضعیت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی ۶۰ روز تغذیه با سطوح مختلف مخلوط پروبیوتیک تجاری دی پرو اکوا.

آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار. حروف متفاوت نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($n=9$, $P<0/05$). جیره شاهد (خوراک تجاری ماهی فاقد افزودنی)، تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب واجد سطوح ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم خوراک پایه بودند.

نتایج حاصل از میزان تغییرات لایزوزیم در تیمارهای مختلف تغذیه‌شده با مقادیر مختلف باسیلوس‌های پروبیوتیک در شکل ۲ نشان داده شده است. تیمار ۳ دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم لایزوزیم بود ($P<0/05$). تیمار شاهد نیز دارای کمترین میزان این آنزیم بود و این تیمار تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد ($P<0/05$).



شکل ۲: میزان آنزیم لایزوزیم در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی ۶۰ روز تغذیه با سطوح مختلف مخلوط پروبیوتیک تجاری دی پرو اکوا. آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار.

حروف متفاوت نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($n=9$, $P<0/05$). جیره شاهد (خوراک تجاری ماهی فاقد افزودنی)، تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب واجد سطوح ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم خوراک پایه بودند.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اکثر فاکتورهای تغذیه‌ای و رشد ماهیان تغذیه‌شده با مخلوط پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت که البته افزودن ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیک به ازای کیلوگرم خوراک سبب شد تمام این فاکتورها به مقدار حداکثری خود نسبت به سایر تیمارها برسند. این بدان معنی است که استفاده از مخلوط پروبیوتیک، باعث کاهش در مقدار غذای مصرفی و افزایش رشد ماهی‌ها را به دنبال داشته که می‌تواند منجر به کاهش بسزایی در هزینه‌های پرورش گردد. محققین متعددی گونه‌های مختلفی از باکتری‌های جنس *Bacillus* شامل *circulans*, *pumilus* و *cereus subtilis* را از روده ماهیان کپور معمولی و کپور ماهیان هندی جدا کرده و در شرایط آزمایشگاهی وجود آنزیم‌های خارج از سلولی آمیلاز، لیپاز و پروتازمی را از آن‌ها گزارش نموده و بیان کردند که استفاده از این باکتری‌ها در فرمولاسیون جیره‌های ماهیان کپور انگشت قد رو هو سبب بالا بردن عملکرد رشد و ایمنی می‌شود (Ghosh et al., 2002; Bairagi et al., 2002, 2004). برای مثال همسو با نتایج این مطالعه، Bairagi و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند مخلوط پروبیوتیکی *B. subtilis* و *B. circulans* در جیره غذایی ماهی کپور هندی رو هو سبب افزایش نسبت کارایی پروتئین، قابلیت هضم ظاهری و بهره‌برداری ظاهری پروتئین و افزایش معیارهای رشد و بقاء می‌گردد. همچنین در مطالعات مشابه دیگر Bagheri و همکاران (۲۰۰۸) به کارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیک شامل *B. licheniformis* و *B. subtilis* در لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش وزن نهایی شد. در مطالعه دیگری Lee و همکاران (۲۰۱۷) اثر مثبت افزایش سطح مکمل سازی جیره‌های غذایی توسط مخلوط پروبیوتیکی *B. subtilis* و *L. plantarum* را روی عملکرد رشد و پارامترهای ایمونولوژیک سرم خون مارماهی ژاپنی گزارش کردند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که معمولاً با اهداف افزایش رشد و بازماندگی، کمک در افزایش هضم و جذب غذا (با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی)، رقابت با سویه‌های بیماری‌زا و جایگزینی در محیط و دستگاه گوارش (از طریق بالانس میکروبی دستگاه گوارش) و کمک به تجزیه مواد آلی سبب بهبود عملکرد تغذیه‌ای و فاکتورهای رشد ماهیان پرورشی می‌شود (Gatesoupe, 1999). یکی دیگر از علل افزایش عملکرد رشد در این مطالعه را می‌توان این‌گونه توجیه نمود که پروبیوتیک‌های باسیلوسی بسته به گونه و سویه ممکن است باعث سطوح مختلفی از بهبود قابلیت هضم خوراک و اشتها (توسط تولید آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئیناز) و سنتز مواد مغذی ضروری نیز مثال اسیدهای چرب، بیوتین و ویتامین B12 در روده ماهیان بشوند (Tovar et al., 2002; Newaj-Fyzul et al., 2014).

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، شمارش افتراقی تعداد نوتروفیل تیمار ۳ نسبت به گروه‌های دیگر افزایش یافت. نتایج مشابه‌ای توسط Aly و همکاران (۲۰۰۸) روی مکمل سازی جیره‌های ماهی تیلپیا (*Tilapia niloticus*) با پروبیوتیک‌ها گزارش شده است. احتمالاً این افزایش به دنبال بهبود سیستم ایمنی و افزایش توانایی بیگانه‌خواری باشد (Gopalakannan and Arul, 2011).

نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش میزان مخلوط پروبیوتیک دی پرو آکوا میزان لایزوزیم سرم خون ماهی کپور معمولی افزایش و به حداکثر مقدار خود در تیمار ۰/۹ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم رسید. به‌طور مشابه، Zhang و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر مثبت *B. subtilis* را روی ایمنی غیراختصاصی بچه ماهی پامپانو (*Trachinotus ovatus*) از طریق افزایش فعالیت لایزوزیمی گزارش کرده‌اند. همچنین Liu و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند افزودن *B. subtilis* به جیره غذایی ماهی تیلپیا نیل بعد از ۲ هفته سبب افزایش فعالیت انفجار تنفسی و فعالیت لیزوزوم سرم می‌شود. این احتمال وجود دارد که پروبیوتیک‌ها از طریق با ترشح برخی از ترکیبات بازدارنده نظیر پپتیدهای آنتی‌بیوتیکی باعث شوند رشد باکتری‌های مضر کمتر شده و ایمنی غیراختصاصی ماهیان را بالا ببرند (Verschuere, 2000).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که اگرچه نتایج برخی فاکتورهای خونی و ایمنی نشان از عدم اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای تغذیه‌شده با مخلوط پروتیک داشت، اما اکثر پارامترهای رشد در تیمار واجد ۰/۹ گرم مخلوط پروبیوتیک دی پرو آکوا (شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis*) به ازای هر کیلوگرم خوراک به‌طور معنی‌داری حداکثر بود. بنابراین افزودن دی پرو آکوا می‌تواند اثرات مثبتی در رشد،

بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی داشته باشد و این اثر مثبت در نهایت در سطح گسترده پرورش باعث افزایش تولید و کاهش هزینه خواهد شد. البته انجام تحقیقات تکمیلی در خصوص اثرات این مخلوط پروبیوتیک بر مرفولوژی پرزهای روده و آنزیم‌های گوارشی در ماهی کپور معمولی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین‌وسیله از شرکت تک ژن به‌واسطه در اختیار گذاشتن مخلوط تجاری پروبیوتیک دی‌پرو آکوا تشکر می‌نمایند.

منابع

- جعفریان، ح.، خسروی، غ.، عبدالمهی، د. و توانا، س.، ۱۳۹۳. تأثیر مخلوط باسیلوس‌ها *Bacillus spp* و مخمر ساکارومایسس سرویزیای *Saccharomyces cerevisiae* جداشده از روده فیل‌ماهی *Huso huso* بر پارامترهای رشد و تغذیه در لارو ماهی کپور نقره‌ای *Hypophthalmichthys molitrix*. تغذیه و بیوشیمی آبزیان، سال اول، شماره دوم، صفحات ۱۲-۱.
- سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳. دفتر برنامه‌ریزی گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، ناشر سازمان شیلات ایران، ۷۳ ص.
- لیائی، ز.، آبرومند، غ. و ضیایی نژاد، س.، ۱۳۹۵. تأثیر باکتری زیست‌یاب *Bacillus subtilis* مستخرج از روده ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* بر عملکرد رشد و بقا آن. توسعه آبزی‌پروری، سال دهم، شماره دوم، صفحات ۹۹-۱۰۸.
- ناصری، س.، خارا، ح. و شکوری، م.، ۱۳۸۹. تأثیر باکتری‌های *B. licheniformis* و *Bacillus subtilis* به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیکی و ترکیب آهن فرسولفات بر برخی فاکتورهای خونی لارو ماهی قزل‌آلا طی دوره انکوباسیون. زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۵، صفحات ۵۷۷-۵۶۷.

- Aly, S. M., Ahmed, Y. A., Ghareeb, A. A. and Mohamed, M. F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia niloticus* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- A.O.A.C, 2000. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington.D.C, USA.
- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfar, A., 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1): 43-48.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10:109-121
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 35:436-446.
- Borges, A., Scotti, L. V., Siqueira, D. R., Jurinitz, D. F. and Wassermann, G. F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30: 21- 25.
- Ellis, A. E., 1990. Lysozyme assay, *Techniques in Fish Immunology*. Fair Haven, P. 103.
- FAO, 2017. Fisheries and aquaculture statistics. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, P. 78.
- Feldman, B. F., Zinkl, J. G. and Jian, N. C., 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins publication, Philadelphia, P. 32.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180:147-165.

- Ghosh, K., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2002.** Characterization of *Bacillus* isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. *Applied Aquaculture*, 12:33-42
- Gopalakannan, A. and Arul, V., 2011.** Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture international*, 19(5): 973-985.
- Guler, G. O., Kiztanir, B., Aktumsek, A., Citil, O. B. and Ozparlak, H., 2008.** Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition and w3/w6 ratios of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle lipids in Beysehir Lake. *Food Chemistry*, 108: 689-694.
- Helland, S. J., Grisdale Helland, B. and Nerland, S., 1996.** A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture*, 139: 157-163.
- Hevroy, E. M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M. and Hemre, G. I., 2005.** Nutrition utilization in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11: 301-313.
- Hushangi, R. and Hosseini Shekarabi, S.P., 2018.** Effect of a peracetic acid-based disinfectant on growth, hematology and histology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fishes*, 3: 10. doi: 10.3390/fishes3010010.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. *Fish Diseases*, 25(11): 633-642.
- Lee, S., Katya, K., Park, Y., Won, S., Seong, M. and Bai, S. C., 2017.** Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish and Shellfish Immunology*, 61: 201-210.
- Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y. and Xie, Z., 2017.** Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 60:326-333.
- Miranda, C. D., Jopia, P., González-Rocha, G., Guiliani, N., Sossa, K. and Urrutia, H., 2015.** Growth inhibition of bacterial fish pathogens and quorum-sensing blocking by bacteria recovered from Chilean salmonid farms. *Journal of Aquatic Animal Health*, 27(2): 112-122.
- Nayak, S. K., 2010.** Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, H. and Austin, B., 2014.** Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431:1-11.
- Ringo, E. and Birkbeck, T. H., 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30(2): 73-93.
- Soltani, M., Pakzad, K., Taheri-Mirghaed, A., Mirzargar, S., Shekarabi, S. P. H., Yosefi, P. and Soleymani, N., 2017b.** Dietary application of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 enhances immune status and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-13.
- Tovar, D., Zombonino-Infante, J. L., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vazquez, R. and Lasel, R., 2002.** Effects of live yeast incorporation in compound diet digestion enzymes activity in sea bass larvae. *Aquaculture*, 204: 113-123.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews Applied microbiology*, 64: 655-671
- Zhang, Q., Yu, H., Tong, T., Tong, W., Dong, L., Xu, M. and Wang, Z., 2014.** Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide enhance the growth, non-specific immunity of juvenile ovate pompano, *Trachinotus ovatus* and its disease resistance against *Vibrio vulnificus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 38(1):7-14.