

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (باکتوسل) بر رشد، فلور میکروبی و توان باکتری کشی مخاط پوست ماهی گورخری (*Danio rerio*)

مجتبی محمدی ارانی^{۱*}، امید صفری^۲، سید کمال الدین علامه^۳، سعید اسدالله نصرآبادی^۴، محمد جواد محمدی^۵، قاسم عشوری^۶، سالار درافشان^۴، حمید احمدنیا^۲، محمد رضا عباسی^۶، محمد سعید گنجور^۳

*Mma_201333@yahoo.com

- ۱- گروه آموزشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
- ۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
- ۳- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
- ۴- گروه شیلات، دانشکده مهندسی منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران
- ۵- اداره کل شیلات استان سیستان و بلوچستان، ایران
- ۶- مدیریت شیلات و امور آبزیان، سازمان جهاد کشاورزی استان اصفهان

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۹

چکیده

در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* شامل صفر، 1×10^6 ، 2×10^6 ، 4×10^6 و 8×10^6 سلول پروبیوتیک در گرم غذا (cfug^{-1}) در یک طرح کاملاً تصادفی در ماهی گورخری به مدت ۶۰ روز بر رشد، فلور میکروبی روده و توان باکتری کشی مخاط پوست مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین شاخص‌های رشد شامل وزن، طول و نرخ رشد ویژه و نیز کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی $4 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$ ثبت شد ($p < 0.05$). بیشترین جمعیت کل باکتریایی و بیشترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک روده نیز در تیمار مذکور به دست آمد ($p < 0.05$). همچنین بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *Edwardsiella tarda* و *Vibrio anguillarum*، *Flavobacterium columnare*، *Aeromonas hydrophilla* در تیمار حاوی $4 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$ به دست آمد ($p < 0.05$). لذا، به نظر می‌رسد که پروبیوتیک *P. acidilactici* شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی گورخری را بهبود می‌بخشد و می‌تواند به میزان $4 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$ در غذا، مورد استفاده این ماهی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، رشد، ایمنی، *Pediococcus acidilactici*، ماهی گورخری

مقدمه

در دهه‌های گذشته شیوع آلودگی‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی ضررهای اقتصادی قابل توجه بر تولید صنعت آبی‌پروری جهانی وارد کرده که برای مهار و کنترل آنها، انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها به مقدار زیاد مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اما آنتی‌بیوتیک‌ها به تدریج با افزایش مقاومت سویه‌های باکتریایی، باعث پیدایش خطراتی برای سلامت عمومی شده‌اند. با توجه به این موضوع، از دهه گذشته محدودیت‌های گسترده‌ای برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای حیوانات، مطرح شده است (Wang et al., 2008; Carnevali et al., 2016). از این‌رو، ضروری بود برای گونه‌های پرورشی موادی که قادر به افزایش قدرت سیستم ایمنی هستند، شناسایی و مورد استفاده قرار گیرند. از جمله محرک‌های ایمنی می‌توان به پروبیوتیک‌ها، پریبیوتیک‌ها، سین‌بیوتیک‌ها، نوکلئوتیدها، اسیدهای آلی و افزودنی‌های گیاهی اشاره کرد که این مواد در افزایش رشد و سلامتی میزبان بهترین نتایج داشتند (Balcazar et al., 2006a; Akrami et al., 2009a; Nayak, 2010; Hoseinifar et al., 2011a; Martinez Cruz et al., 2012; Carnevali et al., 2016; Safari et al., 2017).

در تعریف Fuller (۱۹۸۹) پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به حد کافی موجود باشند، با اصلاح جمعیت میکروبی روده، باعث بهبود وضعیت سلامتی در میزبان می‌شوند. امروزه مشخص شده است که این توانایی پروبیوتیک‌ها، به اصلاح میکروبیوتای دستگاه گوارش، ترشح باکتری‌کش‌ها و اسیدهای آلی، رقابت با عوامل بیماری‌زا برای چسبیدن به روده و دریافت مواد غذایی و ایجاد اثر ضد میکروبی بر می‌گردد که احتیاج به آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهد (Goldin and Gorbach, 1992; Eslamlou et al., 2012; Carnevali et al., 2014a). پروبیوتیک‌ها باعث ساخت مواد غذایی ضروری مورد نیاز مولدین و لاروها از جمله پروتئین، اسیدهای چرب ضروری و آنزیم‌هایی مثل آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در بدن میزبان می‌شوند که میزبان با افزایش ترشح این آنزیم‌ها، باعث بهبود هضم پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود (Irianto et al., 2002). از سوی دیگر مشخص شده است که وجود پروبیوتیک در غذا بر هماوری، شاخص GSI،

بقاء، طول، وزن و کاهش لاروهای مرده و بد شکل (Ghosh et al., 2007) و بهبود مراحل لاروی ماهیان اثر مثبت دارد (Carnevali et al., 2004; Avella et al., 2011). از سویه‌های پروبیوتیک که معمولاً در فعالیت‌های آبی‌پروری استفاده می‌شوند می‌توان به اعضای از جنس‌های *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Shewanella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* و *Clostridium* اشاره کرد (Carnevali et al., 2013). از جمله باکتری‌های پروبیوتیک می‌توان به *Pediococcus acidilactici* اشاره کرد که نوعی کوکسی گرم‌مثبت است که در طیف گسترده‌ای از pH، دما و فشار اسمزی رشد می‌کند و قادر به چسبیدن به روده ماهی و کلون شدن در آن است. کارایی این باکتری در بهبود رشد و ایمنی در بعضی گونه‌های پرورش نشان داده شده است. برای مثال، استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* در جیره غذایی ماهی اسکار (*Oscar astronautus*)، منجر به، وزن نهایی بیشتر و ضریب تبدیل غذایی کمتری در مقایسه با گروه شاهد گردید (saffari et al., 2013).

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی تأثیر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر فلور روده و سیستم ایمنی تیلاپای قرمز (*Oreochromis niloticus*) دریافتند که باکتری مذکور جمعیت‌های باکتریایی را در روده این ماهی اصلاح کرده و سیستم‌های دفاع غیر اختصاصی را تحریک می‌کند. Safari و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* در جیره غذایی ماهی اسکار (*Oscar astronautus*)، دریافتند که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک مذکور، وزن نهایی بیشتر و ضریب تبدیل غذایی کمتری نسبت به گروه شاهد دارند.

Standen و همکاران (۲۰۱۳) متذکر شدند که باکتری *P. acidilactici* باعث بهبود سیستم ایمنی در ماهی تیلاپیا (*O. niloticus*) می‌شود.

Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تأثیر پروبیوتیک *P. acidilactici* در جیره غذایی میگوی پاسبید (*Litopenaeus vannamei*)، بیشترین میزان افزایش وزن (WG)، ضریب

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل پنج تیمار و سه تکرار، به مدت ۶۰ روز به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار پروبیوتیکی *P. acidilactici* با سطوح 1×10^9 ، 2×10^9 ، 4×10^9 و 8×10^9 سلول بر گرم غذا (cfug^{-1}) و یک تیمار شاهد (بدون باکتری) بود. غذای تجاری مورد استفاده با عنوان EXS2 توسط شرکت کیمیاگران تغذیه (شهرکرد، چهار محال و بختیاری، ایران) ساخته شده که دارای ۵۰ درصد پروتئین خام، ۱۵ درصد چربی خام، ۱۰٪ رطوبت، ۱۰٪ خاکستر، ۱/۵ درصد فیبر خام، و سایز ۰/۷ - ۰/۴ میلی‌متر بود.

روش تهیه و نگهداری ماهیان آزمایشی و شرایط انجام آزمایش

جهت اجرای آزمایش، ۶۰۰ عدد بچه ماهی گورخری سالم، با سن حدود ۱ ماه، وزن 76 ± 5 میلی گرم و طول 12 ± 3 میلی‌متر از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی خریداری شده و درون کیسه پلاستیکی حاوی اکسیژن به سالن آزمایش‌ها منتقل و درون یک آکواریوم بزرگ نگهداری شدند. بچه ماهیان پس از طی مراحل سازگاری به مدت دو هفته، به صورت کاملاً تصادفی بین واحدهای آزمایشی تقسیم شدند (در ۱۵ آکواریوم به تعداد ۴۰ عدد در هر کدام) و با رعایت منشور اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر (Animal ethic) به مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی به میزان ۱۰ درصد وزن بدن در روز مورد تغذیه قرار گرفتند. در زمان شروع آزمایش بچه ماهیان دارای وزن 120 ± 10 میلی گرم و طول 15 ± 3 میلی‌متر بودند. دوره نوری کارگاه در شبانه‌روز به صورت ۱۰D : ۱۴ L بود. تغذیه دو بار در روز انجام شد. تعویض آب به صورت هفتگی و به میزان ۵۰ درصد حجم آب آکواریوم‌ها انجام شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب سالن انجام آزمایش‌ها به شرح جدول ۱ بود.

تبدیل غذایی (FCR) و نرخ رشد ویژه (SGR) را در جیره‌های آزمایشی مشاهده نمودند.

در تحقیق Abedian و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که پروبیوتیک *P. acidilactici* در غذای ماهی قزل آلا رنگین کمان باعث بهبود شاخص‌های رشد و افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک روده این ماهی نسبت به گروه شاهد می‌شود. روستا و همکاران (۱۳۹۲) دریافتند که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث فعالیت ضد باکتریایی و افزایش ایمنی موکوس ماهی تایگر بارب می‌شود. حسینی مدنی و همکاران (۱۳۹۳) بر تاثیر مثبت پروبیوتیک *P. acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور تاکید کردند.

بیرانوند و همکاران (۱۳۹۴) دریافتند که مکمل جلبک اسپیرولینا در غذای ماهی زینتی گورخری، باعث بهبود رشد آن می‌گردد.

باقری و غفاری فارسانی (۱۳۹۵) تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* را بر شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه، خون شناسی و فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی ماهی سورم طلایی مثبت ارزیابی کردند.

ماهی گورخری (*Danio rerio* Hamilton, 1822) که با اسم‌های زبرا و زبرا دانیو نیز شناخته می‌شود، از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) و زیر خانواده دانیوها (Danioninae) بوده که منشأ آن آبهای شیرین است. حداکثر اندازه آن ۵ سانتی‌متر و حداکثر سن آن ۲ سال می‌باشد. حرارت مطلوب برای نگهداری آن ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد و pH مناسب ۶/۵-۷/۵ می‌باشد. به دلیل سرعت بالای رشد و تکثیر، سهولت نگهداری، تغذیه، پرورش و تکثیر، این ماهی به عنوان مدلی برای انجام بسیاری از آزمایش‌های زیستی تبدیل شده است (Fishman, 2001). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک *P. acidilactici* در غذا بر برخی از شاخص‌های رشد، جمعیت باکتریایی کل و اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک روده، آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد و توان باکتری‌کشی مخاط پوست در ماهی گورخری بوده است.

جدول ۱: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب سالن انجام آزمایش‌ها

پارامتر	دما (°C)	pH	سختی کل (mg/l)	کل جامدات محلول (mg/l)	اکسیژن محلول (mg/l)	نیتريت (mg/l)	نترات (mg/l)
مقدار	28 ± 2	8 ± 0.5	310 ± 10	400 ± 15	8 ± 0.8	0.08 ± 0.02	2 ± 1

روش تهیه جیره‌های غذایی

باکتری مورد استفاده در این طرح *P. acidilactici* (CNCM- MA 18/5 M, Lallemand, France) با نام تجاری باکتوسل (Bactocell) از نمایندگی شرکت لالمند فرانسه در ایران تهیه گردید. غذای مذکور در بسته‌های نیم کیلوپی برای استفاده در غذای دام، طیور و آبزیان تهیه می‌شود، دارای 10^7 cfug⁻¹ باکتری و ۲ سال تاریخ مصرف از زمان تولید می‌باشد. برای اطمینان از زنده بودن باکتری‌ها در زمان آزمایش‌ها، نمونه‌هایی از آن در آزمایشگاه میکروبیولوژی کشت شد و وجود باکتری با غلظت مذکور در نمونه‌های آزمایشی مورد تایید قرار گرفت. جهت آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی، ابتدا مقدار لازم از غذای مورد نظر توزین شده، سپس این غذا بر سطح زمین روی کاغذ گسترده شده و بر روی آن روغن مایع گیاهی به میزان ۱ درصد اسپری گردید. سپس مقدار لازم از پروبیوتیک با ترازوی دقیق توزین شده، روی غذا پخش شده و به صورت دستی، به‌خوبی با غذا مخلوط گردید. به تیمار شاهد تنها روغن اسپری شده و از پروبیوتیک

روش تعیین شاخص‌های رشدی

در پایان دوره آزمایشی ماهی‌ها با توری دستی (ساچوک) برداشت شده و پس از چند لحظه قرار دادن درون پارچه نخی برای خشک شدن آب اطراف بدن آنها، طول ماهیان با استفاده از خط کش بیومتری با دقت ۱ میلی‌متر و وزن با ترازوی دقیق (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. برای تعیین شاخص‌های رشد از معادله‌های ذیل استفاده شد (Abedian et al, 2017):

وزن نهایی (میلی‌گرم) - وزن اولیه (میلی‌گرم) = افزایش وزن بدن (میلی‌گرم) (WG)
 طول نهایی (میلی‌متر) - طول اولیه (میلی‌متر) = افزایش طول بدن (میلی‌متر) (LG)
 $(\text{LnW2} - \text{LnW1}) \times 100 / t$ = نرخ رشد ویژه (SGR)

W2 = وزن نهایی (میلی‌گرم)، W1 = وزن اولیه (میلی‌گرم)، t = طول دوره پرورش (روز)

مقدار افزایش وزن به میلی‌گرم / مقدار غذای خورده شده به میلی‌گرم = ضریب تبدیل غذا (FCR)

روش کشت باکتری‌ها

روش کشت عمومی باکتریهای روده ماهی‌ها: برای آگاهی از جمعیت باکتری‌ها در روده، از هر تیمار ۳ ماهی برداشت شده و پس از آسان‌کشی با پودر گل میخک به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، سطح بدن ماهی با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و با آب اتوکلاو شده شستشو گردید. سپس در شرایط کاملاً استریل شکم ماهی باز، روده آن جدا و توزین

در ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه مخاط قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه با آن آغشته گردید. سپس دیسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط‌های کشت باکتریایی، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت دیسک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و قطر هاله‌های عدم رشد باکتری با خط‌کش اندازه‌گیری شد. هر کدام از هاله‌های تمیز محاصره شده در دیسک‌ها به عنوان فعالیت ضد باکتریایی مخاط شناخته شد (Safari et al., 2017).

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-wilk و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene بررسی گردید. سپس برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌های مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و برای مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. سطح معنی‌داری قابل قبول در کلیه آزمون‌های آماری مورد استفاده به صورت $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۳ انجام گردید. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شدند.

نتایج

نتایج شاخص‌های رشد

در بررسی نتایج به‌دست آمده از شاخص‌های رشد، تیمار حاوی $10^6 \text{ cfug}^{-1} \times 4$ دارای بیشترین افزایش وزن، طول و نرخ رشد ویژه (به‌ترتیب معادل 522 ± 8 میلی‌گرم، 45 ± 1.5 میلی‌متر و 2.79 ± 0.02 درصد بر روز) بود که جز با تیمار حاوی $10^6 \text{ cfug}^{-1} \times 8$ ، با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). کمترین مقادیر مذکور به تیمار شاهد (به‌ترتیب معادل 251 ± 12 میلی‌گرم، 25 ± 1.5 میلی‌متر و 1.88 ± 0.05) تعلق داشت. در مورد ضریب تبدیل غذایی، کمترین مقدار (به‌ترتیب 2.17 ± 0.05) به تیمار حاوی $10^6 \text{ cfug}^{-1} \times 4$ تعلق داشت که جز با تیمار حاوی $10^6 \text{ cfug}^{-1} \times 8$ با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت ($p < 0.05$) و بیشترین مقدار آن متعلق به جیره شاهد (3.75 ± 0.0) بود (جدول ۲).

اضافه شده و سپس محیط کشت نوترینت آگار مذاب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به پلیت اضافه شد. پس از سرد شدن، محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور در دمای آب محیط پرورش (۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد که در نتیجه، کلنی‌های باکتریایی در سطح و عمق محیط کشت رشد کردند. پلیت‌هایی که دارای ۳۰-۳۰۰ کلنی بودند شمارش شده، تعداد کلنی‌ها در عکس ضریب رقت ضرب و تعداد تقریبی باکتری‌های موجود در یک گرم بافت روده ماهی (cfug^{-1}) محاسبه گردید (Karim, 2003).

روش کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک روده ماهی‌ها: در این روش مطابق روش قبل رقت‌های سریالی ساخته شده سپس ابتدا محیط کشت MRS Broth که ویژه رشد باکتری‌های اسید لاکتیک است، به پلیت‌ها اضافه شد. پس از سرد شدن و شکل گرفتن، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر به پلیت اضافه شده و با آنس استریل به طور کامل در سطح پلیت پخش گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در جاربیه‌هوازی قرار داده شدند. در این روش پس از انکوباسیون، کلنی باکتری‌ها تنها در سطح محیط کشت رشد خواهند کرد. در ادامه مطابق با روش قبل تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در یک گرم بافت روده ماهی شمارش و محاسبه گردید (Karim, 2003).

روش انجام آزمایش توان باکتری‌کشی مخاط پوست ماهی‌ها (تست آنتی‌بیوگرام)

بررسی توان باکتری‌کشی مخاط پوست ماهی گورخری با استفاده از پتری‌دیش‌هایی که در آن محیط کشت آگار گسترده شده بود، انجام گردید. برای این امر بر اساس گزارش‌های بیماری‌های ماهیان زینتی (Trust and Bartlet, 1974; Robet et al., 2009) چهار سویه باکتری (ATCC 49512)، *Aeromonas hydrophilla* (7966)، *Flavobacterium columnare* (ATCC 19264)، *Vibrio anguillarum* (ATCC 15947) و *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947) انتخاب گردیدند. پس از کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت Nutrient broth (Merck, Germany)، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر کشت (CFU $10^8 \times 1/5$) در محیط کشت نوترینت آگار کشت گردید. سپس دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ میلی‌متر

جدول ۲: میانگین (± انحراف معیار) افزایش وزن (mg)، طول نهایی (mm)، نرخ رشد ویژه (%/day) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در ماهیان گورخری تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف *P. acidilactici* به مدت ۶۰ روز در سه تکرار

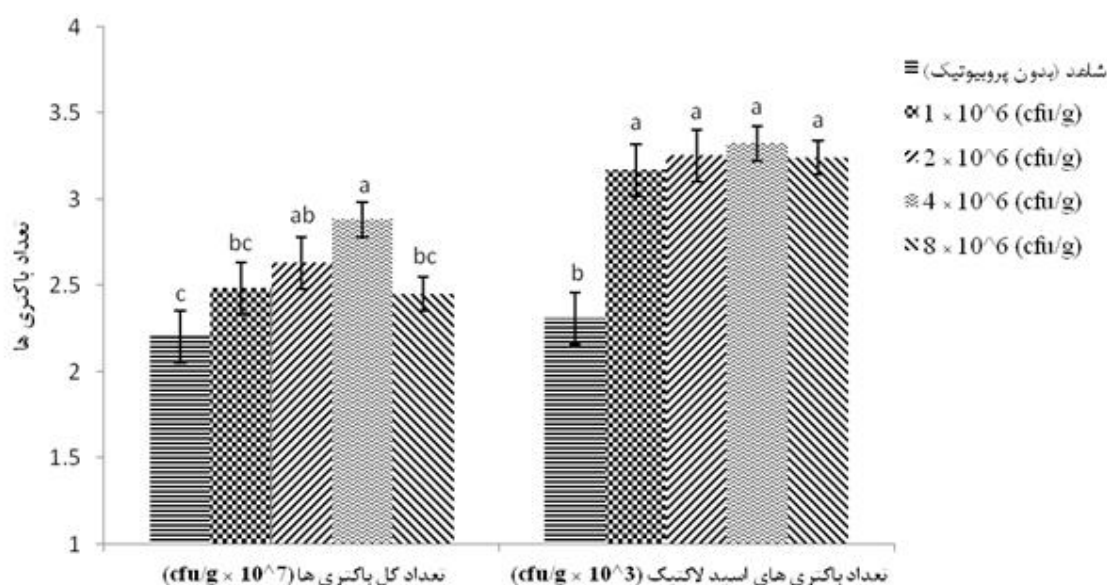
تیمار ۱ (شاهد) (۰ cfug ⁻¹)	تیمار ۲ (۱×۱۰ ^۶ cfug ⁻¹)	تیمار ۳ (۲×۱۰ ^۶ cfug ⁻¹)	تیمار ۴ (۴×۱۰ ^۶ cfug ⁻¹)	تیمار ۵ (۸×۱۰ ^۶ cfug ⁻¹)	
۲۵۱ ± ۱۲ ^d	۲۹۳ ± ۷ ^c	۳۸۳ ± ۱۴ ^b	۵۲۲ ± ۸ ^a	۵۱۵ ± ۱۱ ^a	افزایش وزن (mg)
۲۵ ± ۱/۵ ^c	۳۹ ± ۱/۰ ^b	۴۰ ± ۱/۵ ^b	۴۵ ± ۱/۵ ^a	۴۳ ± ۲/۱ ^a	طول نهایی (mm)
۱/۸۸ ± ۰/۰۵ ^d	۲/۰۶ ± ۰/۰۳ ^c	۲/۳۸ ± ۰/۰۴ ^b	۲/۷۹ ± ۰/۰۲ ^a	۲/۷۷ ± ۰/۰۳ ^a	نرخ رشد ویژه (% day ⁻¹)
۳/۷۵ ± ۰/۰۹ ^a	۳/۲۱ ± ۰/۰۷ ^b	۲/۶۸ ± ۰/۰۴ ^c	۲/۱۷ ± ۰/۰۵ ^d	۲/۲۴ ± ۰/۰۳ ^d	ضریب تبدیل غذایی

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست (p < ۰/۰۵)

نتایج حاصل از کشت عمومی و کشت باکتری‌های اسید لاکتیک

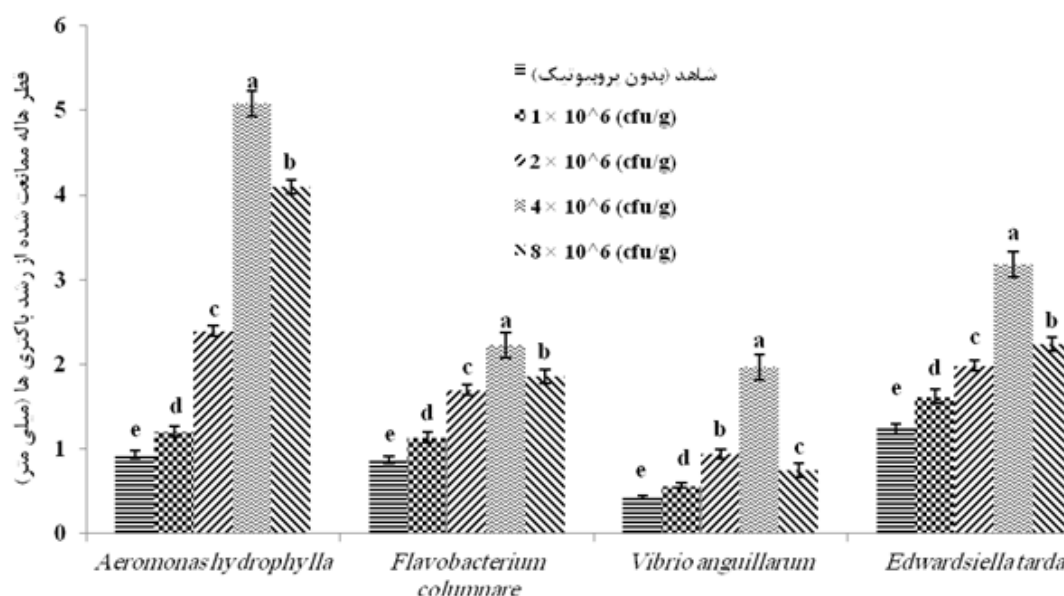
در بررسی جمعیت کلی باکتری‌ها مشاهده شد که بیشترین تعداد کل باکتری (۲/۸۸±۰/۱۰ cfug⁻¹ × 10⁷) در تیمار حاوی ۴×۱۰^۶ cfug⁻¹ بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت. کمترین مقدار تعداد کل باکتری در تیمار شاهد (۲/۲۰±۰/۰۲ cfug⁻¹ × 10⁷) مشاهده شد که به جز تیمار حاوی ۱×۱۰^۶ cfug⁻¹ با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت.

اما در خصوص تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک تیمارهای حاوی ۲×۱۰^۶ cfug⁻¹، ۴×۱۰^۶ cfug⁻¹ و ۸×۱۰^۶ cfug⁻¹ دارای بیشترین تعداد باکتری است که با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند اما با تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱×۱۰^۶ cfug⁻¹ دارای تفاوت معنی‌دار بودند (p < ۰/۰۵). بیشترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (۳/۳۲±۰/۰۱ cfug⁻¹ × 10³) به تیمار حاوی ۴×۱۰^۶ cfug⁻¹ و کمترین مقدار آن (۲/۳۱±۰/۰۶ × 10³) به تیمار شاهد تعلق داشت (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین (± انحراف معیار) تعداد کل باکتری ها (cfug⁻¹ × 10⁷) و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (cfug⁻¹ × 10³) در ماهیان گورخری تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف *P. acidilactici* به مدت ۶۰ روز در سه تکرار (حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست (p < ۰/۰۵)).

اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). کمترین قطر هاله عدم رشد برای هر کدام از باکتری‌های مذکور به تیمار شاهد (به ترتیب معادل 0.93 ± 0.03 ، 0.87 ± 0.01 ، 0.43 ± 0.01 و 1.24 ± 0.11 میلی‌متر) تعلق داشت. بدین ترتیب، مشخص می‌شود که مخاط پوست ماهی گورخری در تیمارهای پروبیوتیک و به‌ویژه تیمار حاوی 4×10^6 cfu/g دارای بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های مذکور بود (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین ($\pm$ انحراف معیار) قطر هاله عدم رشد باکتریهای *A. hydrophilla*، *F. columnare*، *V. anguillarum* و *E. tarda* در مخاط پوست ماهی گورخری تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف *P. acidilactici* به مدت ۶۰ روز در سه تکرار (حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$)).

بحث و نتیجه گیری

طبق نتایج این تحقیق استفاده از پروبیوتیک در غذای ماهی گورخری باعث افزایش وزن، طول نهایی، نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی شدند به‌طوری‌که در تمامی شاخص‌های مذکور، تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند. این امر برای پرورش‌دهندگان آبزیان زینتی یک نکته مثبت به حساب می‌آید. زیرا باعث کاهش هزینه‌ها و تسریع در رسیدن ماهی به وزن و سایز مناسب برای فروش یا شروع تولید مثل می‌گردد. این یافته‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققین (Safari et al., 2013; Ahmadi et

al., 2014) مشابهت داشت. علت این امر به ویژگی‌های خاص پروبیوتیک‌ها بازمی‌گردد. همان‌طوری‌که در نتایج محققین مختلف بیان شد، پروبیوتیک‌ها، آنزیم‌های مختلف گوارشی مثل آمیلاز، لیپاز، پروتئاز و آلکالین فسفاتاز را تولید می‌کنند یا روده میزبان را به تولید بیشتر این مواد تحریک می‌کنند (Ringo et al., 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006; Eslamloo et al., 2012; Ahmadi et al., 2004). در نتیجه، هضم و جذب مواد مختلف از جمله پروتئین‌ها و لیپیدها بهتر می‌شود (Irianto et al., 2002; Haroun et al., 2006) و نتایج آن در رشد بهتر موجود نمایان می‌گردد.

مذکور، تضمین لازم را برای عدم ایجاد بیماری برای پرورش دهندگان ماهی زینتی گورخری ایجاد می کند که خود دستاورد مهمی در ایجاد سلامتی و عدم نیاز به داروها و آنتی بیوتیک ها به حساب می آید. در تعریف Fuller (۱۹۸۹) نیز بیان شد که پروبیوتیک ها با ترشح مواد ضد باکتریایی و باکتری کش ها احتیاج به آنتی بیوتیک ها را کاهش می دهند. Laloo و همکاران (۲۰۰۷) نیز با به کارگیری سویه های *Bacillus* جدا شده از ماهیان کپور، در گونه های ماهیان زینتی متوجه کاهش پاتوژن *A. hydrophylla* شدند که در تحقیق حاضر تأثیر مثبت پروبیوتیک مورد آزمایش علاوه بر باکتری مذکور، بر سه گونه باکتری بیماری زای دیگر نیز تأیید شد.

در یک نتیجه گیری کلی می توان اذعان کرد که استفاده از پروبیوتیک ها در بسیاری از جنبه های رشد، فلور میکروبی و آنزیم های روده، ایمنی و مبارزه با پاتوژن ها تأثیر مثبت به سزایی دارد. در واقع، استفاده از پروبیوتیک نوعی مبارزه ارگانیک موجود با عوامل بیماری زا به حساب می آید. با توجه به نقش مثبت استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* در شاخص های رشد، جمعیت های میکروبی کل و اختصاصی اسید لاکتیک و ایمنی مخاط پوست در نابودی پاتوژن ها در ماهی گورخری در تحقیق حاضر، پیشنهاد می گردد که از مقدار 0.4 gr/Kg معادل $4 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$ پروبیوتیک *P. acidilactici* در هر گرم غذای این ماهی استفاده گردد. گرچه نتایج این تحقیق قابل تعمیم به سایر ماهیان زینتی و خوراکی نیز می باشد اما برای کسب نتایج دقیق تر لازم است که تحقیق حاضر بر سایر گونه های ماهیان نیز انجام گردد تا غلظت مناسب پروبیوتیک برای هر گونه ماهی به دقت تعیین گردد. همچنین پیشنهاد می گردد، ترکیب پروبیوتیک مذکور با پروبیوتیک های مختلف نیز مورد آزمایش قرار گیرد.

منابع

باقری، ط. و غفاری فارسانی، ح.، ۱۳۹۵. اثر پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* بر شاخص های رشد و کارایی تغذیه، خون شناسی و فعالیت های آنزیمی گوارشی ماهی سورم طلایی *Heros severus* Heckel

(Carnevali et al., 2006a). از سوی دیگر، باکتری ها با تولید ویتامین های مختلف مثل ویتامین B1 و B12، باعث بهبود رشد و کاهش تلفات یا بدشکلی لاروها می شوند (Ghosh et al., 2007). همچنین اسیدهای چرب کوتاه زنجیره پروبیونیک اسید، بوتیریک اسید و استیک اسید با تأثیر بر فلور و کارکرد روده و تولید انرژی در بهبود عملکرد روده و در نتیجه کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش رشد تأثیر زیادی دارند (Safari and Paolucci, 2018).

از سوی دیگر، در این تحقیق به کارگیری پروبیوتیک باکتوسل باعث افزایش جمعیت کلی باکتری ها و افزایش جمعیت باکتری های اسید لاکتیک در روده ماهی گورخری نیز شد که این امر باعث عملکرد بهتر دستگاه گوارش ماهی می گردد. Fuller (۱۹۸۹) نیز اذعان داشت که پروبیوتیک ها باعث بهبود جمعیت های میکروبی روده ماهی می شوند. همچنین در تحقیق Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) پروبیوتیک *P. acidilactici* باعث بهبود فلور میکروبی روده ماهی تیلاپای قرمز (*O. niloticus*) شد. در تحقیق Abedian و همکاران (۲۰۱۷) نیز وجود پروبیوتیک *P. acidilactici* در غذا باعث افزایش باکتری های اسید لاکتیک روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان گردید. لذا، به نظر می رسد که به کارگیری پروبیوتیک باعث افزایش تعداد کل باکتری ها و باکتری های اختصاصی اسید لاکتیک روده ماهی نیز می شود که این امر به بهبود هضم و جذب غذا کمک می کند و باعث کاهش اتصال باکتری های پاتوژن از جمله (*A. hydrophylla*) می گردد (Laloo et al., 2007) که این امر به نوبه خود نقش اساسی در بهبود رشد و سیستم گوارش ماهی دارد. هر چند تحقیقات بیشتری نیاز است تا مکانیسم دقیق پروبیوتیک *P. acidilactici* بر جمعیت کل باکتری ها و تیره های اصلی باکتری های با قابلیت ایجاد کلونی نیز مشخص شود.

در تحقیق حاضر، کاربرد پروبیوتیک *P. acidilactici* با افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری های *F. A. hydrophylla*، *V. anguillarum*، *columnare* و *E. tarda* همراه بود. برای مثال، قطر هاله عدم رشد در تیمار حاوی $4 \times 10^9 \text{ cfug}^{-1}$ نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۵/۵، ۲/۶، ۴/۶ و ۲/۶ برابر بیشتر بود. لذا، می توان اذعان داشت که استفاده از پروبیوتیک باکتوسل با ایجاد ایمنی قوی در مقابل باکتری های بیماری زای

- (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13(14): 877-885.
- Akrami R., Ghelichi A. and Manuchehri H., 2009a.** Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Marine Science and Technology Research*, Islamic Azad University, Tehran Shomal Branch, 4: 1-9.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Ribeco, C., Cresci, A., Palermo, F., Polzonetti, A. and Carnevali, O., 2011.** Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture*, 315, 384-393.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J.L., 2006a.** The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3e4), 173-186.
- Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M. and Cresci, A., 2004.** Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, 12, 377-386.
- Carnevali, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006a.** Well-fare and growth improvement by probiotics in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 258, 430-433.
1840. نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی. دوره چهارم. شماره ۲. صص ۹۳-۱۰۳.
- بیرانوند، م.، قائنی، م. و ولایت زاده، م.، ۱۳۹۴. تاثیر مکمل جلبک اسپیرولینا (*Spirulina sp.*) بر رشد و تغذیه ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio* Hamilton, 1822). یافته های نوین در علوم زیستی. ۲: ۲۰۷-۲۱۵.
- حسینی مدنی، ن.، مورکی، ن.، انوار، س.، منوچهری، ح. و قربانی، م. ۱۳۹۳. اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*). مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی-پژوهشی. سال یازدهم. تابستان. ۲: ۱۲۹۱-۱۳۰۲.
- خدادادیان ز.، و حسینی فر، س. ح.، ۱۳۹۴. ایمنی موکوس و اهمیت آن در ماهیان زینتی. مجله آبزیان زینتی. سال دوم. شماره ۴: ۷-۱۳.
- روستا، ز.، حاجی مرادلو، ع.، حسینی فر، س. ح. و وکیلی، ف.، ۱۳۹۲. اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی شاخص های ایمنی موکوسی ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*). مجله بوم شناسی آبزیان. ۳ (۲) صص ۲۰-۱۳.
- Abedian amiri, A. Azari Takami, GH., Afsharnasab, M. and Razavilar V., 2017.** The comprative effects of dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium* on feed utilization, various health-related characteristics and yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walxaum, 1972). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(2), 753- 773.
- Ahmadi, S., Soltani, M., Shmsaie, M., Rajabi. H. and Peyghan, R., 2014.** Comprative effect of *Pediococcus acidilactici* as probiotic and vitamin C on survival, growth performance and enzyme activities of white leg shrimp

- Carnevali, O., Avella, M. and Gioacchini, G., 2013. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General and comparative endocrinology*, 188:297-302.
- Carnevali, O., 2014a. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. *Zebrafish*, 11, 98–106.
- Carnevali, O., Maradona, F. and Gioacchini, G., 2016. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, vol34, pp.21-37. <http://dx.doi.org/10.1016/>.
- Eslamloo, K., Falahatkar, B. and Yokoyama, S., 2012. Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6):976-85.
- Ferguson, R.M.W., Mreeifield, D.L. Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S. and Picchetti, S., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109, 851- 862.
- Fishman, M.C., 2001. Genomics: Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science*, 294: 1290-1291.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C., 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38: 518-526.
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L., 1992. Probiotics for humans. In: Probiotics. The Scientific Basis (ed. by R. Fuller), pp.355-376.
- Haroun, E., Goda, A. and Kabir, M., 2006. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37, 1473–1480.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H.A., Poor Amini, M. and Darvish Bastami, K., 2011a. The probiotic effects of dietary inactive yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on growth factors, survival, body composition and intestinal microbiota of Beluga juvenile (*Huso huso*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19: 55-66.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25,633-642.
- Karim, G., 2003. Microbial tests in Foods. Univ. of Tehran. 4 th edit. 517 p.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Gorgens, J. and Gardiner, N., 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1471–1479.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A. and Ramírez Saad, H.C., 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol.*, 916845. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/916845>.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish*

- Immunology*, 29(1), 2–14.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177–203.
- Robert, H.E., Palmeiro, B. and Weber, E.S., 2009.** Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish. *Veterinary Clinic of North America*, 12(3): 610- 638.
- Safari, O. and Mehraban Sang Atash, M., 2013.** Study on the effects of probiotic, *Pediococcus acidilactici* in the diet on some biological indices of Oscar *Astronotus ocellatus*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4(10): 3458-3464.
- Safari, O. and Paolucci, M., 2018.** Effect of in vitro selected synbiotics galactooligosaccharide and mannanoligosaccharide with or without *Enterococcus faecalis* on growth performance, immune responses and intestinal microbiota of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz, 1823. *Aquaculture Nutrition*, 24: 247-259.
- Safari, O., Paolucci, M. and Motlagh, H.A., 2017.** Effects of synbiotics on immunity and disease resistance of narrowclawed crayfish, *Astacus leptodactylus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Fish & Shellfish Immunology*, 64: 392-400.
- Standen, B., Rawling, M., Davies, S., Castex, M., Foey, A. and Gioacchini, G., 2013.** Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal-and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(4):1097-104.
- Trust, T.J. and Bartlett, K.H., 1974.** Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Journal of Applied Microbiology*, 28: 35- 40.
- Wang, Y.B., Li, J.R. and Lin, J., 2008.** Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1):1-4.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., LovettDL, Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M., 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2):516-24.45.

Effect evaluation of *Pediococcus acidilactici* (Bactocell) as a probiotic dietary supplementation, on growth performance, intestine microbiota and skin mucus bactericidal response in zebra fish (*Danio rerio*)

Mohammadi Arani M.^{1*}; Safari O.²; Allame S.K.³; Nasrabadi S.A.⁴; Mohammadi M.J.⁵; Ashouri Gh.⁴; Dorafsha S.⁴; Ahmadnia H.²; Abasi M.R.⁶; Ganjoor M.S.³

*Mma_201333@yahoo.com

- 1-Training Goroup, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Training Center, Agricultural Research, Educating and Extension Organization, Iran
- 2-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
- 3-Animal Science Research Goroup, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Training Center, Agricultural Research, Educating and Extension Organization, Iran
- 4-Department of Natural Resources (Fisheries division), Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- 5-General Department of Fisheries of the Province Sistan and Baluchestan, Iran
- 6-Fisheries and Aquatic Affairs Management, Isfahan Agricultural Jihad Organization, Isfahan, Iran

Abstract

The present study was carried out to assess the effects of different levels of *Pediococcus acidilactici* including 0, 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 and 8×10^6 colony forming unit per g of the diet (cfug⁻¹), in a completely randomized design for 60 days, on growth, intestine flora and skin mucus bactericidal response of zebra fish. The best growth indices including weight, length and specific growth rate and also the least food conversion ratio were recorded in group 4×10^6 cfug⁻¹ ($p < 0.05$). Also the highest number of total viable count and lactic acid bacteria of intestine were found in that group ($p < 0.05$). The most growth inhibition zone of *Aeromonas hydrophyla*, *Flavobacterium columnare*, *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* were found in group 4×10^6 cfug⁻¹ ($p < 0.05$). Therefore, it seems that *P. acidilactici* as a probiotic, improves growth and immunity indices of the zebra fish and could be used as amount of 4×10^6 cfug⁻¹ of food for this fish.

Keywords: Probiotic, Growth, immunity, *Pediococcus acidilactici*, *Danio rerio*