اثرات مکمل سازی جداگانه و ترکیبی *Lactobacillus plantarum* با زایلواولیگوساکارید جیره بر عملکرد رشد، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و پاسخ های فیزیولوژیک بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

وحید مرشدی[۱و۲]، ناصر آق[۱*]، جاسم مرمضی[۲]، فرزانه نوری[۱]، تکاور محمدیان[۴]

۱. پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه. ایران.
۲. پژوهشکده خلیج فارس دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۳. پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور. اهواز. ایران
۴. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۳

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2016.40995

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات جداگانه و ترکیبی پروبیوتیک با پربیوتیک جیره بر عملکرد رشد، پاسخ ایمنی غیراختصاصی، ترکیب لاشه، فعالیت آنزیم گوارشی و فلور باکتریایی روده بچه‌ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) بود. برای این منظور تعداد ۴۲۵ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۳ ± ۷/۶۴ گرم از پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور تهیه شد. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار (۴۵ قطعه ماهی به ازاء هر تکرار) در داخل مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. بچه ماهیان به مدت ۴۲ روز با جیره‌های حاوی ۰ (گروه شاهد)، 1×10^{6} CFU پروبیوتیک (*Lactobacillus plantarum*) در هر گرم غذا (تیمار ۱)، ۰/۵ و ۱ درصد زایلواولیگوساکارید+ 1×10^{6} CFU پروبیوتیک در هر گرم غذا (تیمار ۲ و ۳) در حد ۴/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های لاشه، روده، خون، پلاسما و موکوس جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که پروبیوتیک و پربیوتیک جیره عملکرد رشد، فلور باکتریایی روده و پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهی صبیتی را تغییر نداد ($P > ۰/۰۵$). با این حال فعالیت باکتری کشی پلاسما تیمار شاهد به صورت معنی داری بالاتر از تیمار ۳ بود ($P < ۰/۰۵$). میزان پروتئین و رطوبت لاشه تیمار ۲ اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد فعالیت آنزیم های گوارشی شامل آلکالین پروتئاز، آمیلاز و لیپاز به وسیله افزودن پروبیوتیک و پربیوتیک به جیره تحت تاثیر قرار می گیرد ($P < ۰/۰۵$). به طور کلی، این مطالعه نشان داد که افزودن جداگانه پروبیوتیک و ترکیب با پربیوتیک در مقادیر استفاده شده اثرات مثبتی بر عملکرد رشد، فلور باکتریایی روده و پاسخ ایمنی (به جز فعالیت باکتری کشی پلاسما) ماهی صبیتی ندارد اما فعالیت آنزیم های گوارشی را بهبود می بخشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، ایمنی غیراختصاصی، ترکیب لاشه، آنزیم گوارشی، ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: n.agh@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

پرورش آبزیان به عنوان یکی از فعالیت های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می-شود. چراکه با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، این صنعت سهم بسزایی در تامین نیازهای غذایی مردم را به عهده دارد. در این ارتباط کمبود منابع آب شیرین سبب شده که اولاً پرورش ماهیان دریایی به یکی از شاخه های بسیار مهم و در حال گسترش صنعت آبزی پروری تبدیل شود به طوری که کل تولید آبزی پروری در جهان در سال ۲۰۱۳ در حدود ۹۷/۲ میلیون تن بوده است که سهم آبزیان دریایی پرورشی ۵۲/۴ میلیون تن و سهم ماهیان دریایی پرورشی حدود ۵/۷ میلیون تن است (FAO, 2015). ثانیاً در اکثر کشورها، پرورش نیمه متراکم و سنتی جای خود را به روش های انبوه و متراکم می-دهد. صنعت آبزی پروری علی رغم این رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از آن جمله می توان به تراکم، کیفیت آب و شیوع بیماری اشاره کرد. به علت مشکلات بیان شده امروزه برای پیشگیری از بیماری های عفونی و غیرعفونی در صنعت آبزی پروری به جای دارو درمانی از محرک های ایمنی استفاده می شود. این مواد به عنوان عوامل دارویی برای کنترل بیماری ها، از اهمیت زیادی برخوردار هستند چون فاقد هر گونه اثرات منفی موجود در آنتی بیوتیک ها و واکسن های زنده بر محیط زیست بوده و چون جزء ترکیبات طبیعی محسوب می شوند باقیمانده های داروئی نامطلوب ایجاد نمی کنند (Sakai, 1999). یکی از روش های ایده آل برای کنترل بیماری در آبزی پروری استفاده از مکمل های غذایی می باشد که برخی از این ترکیبات فقط از راه تزریق موثرند ولی بیشتر از راه خوراکی و غوطه وری تاثیر می گذارند که از آن جمله می توان به پروبیوتیک ها و سین بیوتیک ها اشاره کرد (Fatemi and Mirzargar, 2007).

در بین کربوهیدارت ها، عمدتاً اولیگوساکاریدهای غیر قابل هضم به عنوان پربیوتیک در نظر گرفته می شوند (Ziemer and Gibson, 1998). اولیگوساکاریدهای غیر قابل هضم کربوهیدرات‌هایی با وزن مولکولی کم بوده که استفاده از آن ها در جیره غذایی کاهش حضور عوامل بیماری‌زا در فلور روده‌ای و افزایش جمعیت بیفیدوباکتری‌ها و نیز افزایش جذب مواد معدنی در دسترس را به دنبال دارد (Pouramini and Hosseinifar, 2007; Paricheh *et al*., 2016). به نظر می رسد که اغلب پروبیوتیک های معرفی شده به جیره غذایی توانایی ماندگاری، تشکیل پرگنه و جایگزینی در دستگاه گوارش میزبان و یا توانایی رقابت برسر بدست آوردن مواد غذایی را نداشته باشند (Merrifield *et al*., 2010). مطالعات نشان می دهند که استفاده از پربیوتیک و سین بیوتیک (استفاده هم زمان از پروبیوتیک و پربیوتیک) در جیره غذایی ماهی مشکلات مذکور را ندارد (Merrifield *et al*., 2010). همچنین از آنجا که غیر متحمل است، استفاده از یک سویه پروبیوتیک در جیره غذایی منجر به تجمع (کلونی شدن) طولانی مدت در روده شود و این مسئله با تعلق نداشتن سویه های مورد استفاده به فلور معمول و غالب باکتری های زنده روده شدیدتر می شود؛ ایده استفاده از سین بیوتیک ها بیشتر مورد توجه قرار گرفت. به عبارت دیگر، الزام رقابت پروبیوتیک معرفی شده با میکروفلور موجود در روده و توانایی تثبیت و تشکیل کلونی مؤثر سبب شد تا ترکیباتی به اسم سین بیوتیک مطرح شوند (Gibson *et al*., 1998). سین بیوتیک یک اثر سینرژیستی در بالا بردن کارآیی دستگاه گوارش دارد که به صورت مستقیم یا غیر مستقیم باعث تعدیل فلور میکروبی روده میزبان می شود. این ترکیبات باعث افزایش باکتری های مفید روده (باکتری های اسید لاکتیکی و برخی از گونه های مشخص باسیلوس ها)، افزایش رشد، بهبود کارآیی غذایی، بهبود ترکیب شیمیایی عضله میزبان و

افزایش مقاومت به بیماری از طریق تحریک سیستم ایمنی میزبان می شوند (Merrifield *et al*., 2010). مطالعات زیادی بر روی گونه های مختلف ماهیان توسط Essa و همکاران (۲۰۱۰) و Son و همکاران (۲۰۰۹) به طور خاص در مورد تاثیر پروبیوتیک (*L. plantarum*) و Ye و همکاران (۲۰۱۱)، Jenabi و همکاران (۲۰۱۴) و Haghighi و همکاران (۲۰۱۰) در خصوص افزودن سین بیوتیک به جیره صورت گرفته است که برخی از آن ها مبین اثرات مثبت و برخی دیگر حاکی از بی اثر بودن پروبیوتیک و سین بیوتیک در ماهیان است.

به منظور بهبود سلامت و افزایش تولید، راه های جایگزین درمان، نظیر استفاده جدا یا هم زمان پروبیوتیک ها و پربیوتیک ها در جیره غذایی پیشنهاد شده است. با توجه به اهمیت بالای ماهیان دریایی و پتانسیل سواحل جنوبی کشور برای پرورش آن ها انتظار می رود استفاده هم زمان پروبیوتیک و پربیوتیک بر اساس خاصیت سینرژیکی آنها تاثیر بیشتر و بهتری بر پارامترهای تغذیه ای، رشد، بقا و ایمنی ماهی بگذارد. با توجه به اینکه ماهی صبیتی جزء یکی از کاندیداهای مهم جهت پرورش ماهیان دریایی در کشور می باشد و استفاده از مکمل های غذایی مانند پروبیوتیک ها و سین بیوتیک ها کمتر بر روی ماهیان دریایی مورد تحقیق قرار گرفته است. لذا، این تحقیق تاثیر سطوح مختلف پربیوتیک و سین بیوتیک بر شاخص های رشد، تغذیه، پاسخ ایمنی غیراختصاصی، فعالیت آنزیم های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه ماهیان صبیتی را مورد بررسی قرار می دهد.

۲. مواد و روش ها

این تحقیق با همکاری پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور و در بخش تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی انجام شد. بچه ماهیان با وزن ۰/۳ ± ۷/۶۴ گرم از تکثیر بهار مولدین پرورشی مرکز مذکور تامین و در مخازن فایبرگلاس ۴۰۰۰ لیتری در بخش تکثیر و پرورش این مرکز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت انجام این آزمایش ۴ تیمار مختلف غذایی با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای هر تکرار ۴۵ قطعه بچه ماهی صبیتی انتخاب به صورت کاملا تصادفی در بین مخازن فایبرگلاس با ظرفیت ۳۰۰ لیتر (آبگیری تا ۲۵۰ لیتر) محتوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه فرابنفش توزیع شدند. سپس ماهیان به مدت ۶ هفته با تیمارهای غذایی به شرح زیر تغذیه شدند. غذای کنسانتره فاقد پروبیوتیک و سین بیوتیک (گروه شاهد)، غذای کنسانتره حاوی ۱×۱۰^{۶} CFU پروبیوتیک (*Lactobacillus plantarum*) در هر گرم غذا (تیمار ۱)، غذای کنسانتره حاوی ۰/۵ درصد زایلو اولیگوساکارید+ ۱×۱۰^{۶} CFU پروبیوتیک در هر گرم غذا (تیمار ۲)، غذای کنسانتره حاوی ۱ درصد زایلو اولیگوساکارید+ ۱×۱۰^{۶} CFU پروبیوتیک در هر گرم غذا (تیمار ۳)

از جیره غذایی تجاری (شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز) با اندازه ۲ میلی متر استفاده شد (پروتئین ۴۷/۸±۰/۴۱، چربی ۱۳/۹۲±۰/۲۲، رطوبت ۱۰±۰/۱۷، خاکستر ۹/۲۳±۰/۱۲). جهت آماده سازی باکتری (*Lactobacillus plantarum*) و افزودن آن به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. *لاکتوباسیل پلانتاروم* پروبیوتیک از مرکز کلکسیون میکروبی ایران (PTCC, 1058)) و پربیوتیک مورد نیاز از شرکت Longlive Bio-Technology کشور چین خریداری شد. پس از توزین مقدار ۰/۵ و ۱ درصد زایلواولیگوساکارید و حل کردن در سرم فیزیولوژی روی غذا اسپری شد. سپس غلظت ۳ درصد ژلاتین نیز برای پوشش دار کردن غذا و

جلوگیری از هدر رفت افزودنی ها بر روی آن اسپری شد. پس از آماده سازی، غذا درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا از فسادآن جلوگیری گردد. غذادهی ماهیان روزانه در دو نوبت با فاصله زمانی مناسب (۹ و ۱۶) در حد ۴/۵ درصد وزن بدن انجام شد. عوامل فیزیکی و شیمیایی آب روزانه به وسیله دستگاههای دیجیتال قابل حمل مارک WTW با دقت ۰/۰۱ اندازه گیری شد. شرایط محیطی شامل دما (^{o}C) ۰/۹±۲۷/۱)، اکسیژن محلول (ppm ۰/۵۵ ± ۶/۳)، شوری (ppt ۰/۵ ± ۴۸) و pH (۰/۱۵±۷/۵) در طول آزمایش برای تانک ها یکسان بود.

زیست سنجی طول و وزن ماهیان در روزهای شروع آزمایش، وسط و پایان آزمایش صورت گرفت. در طول آزمایش شاخص های رشد و تغذیه با استفاده از فرمول های زیر تعیین شد (Marcouli *et al*., 2006; Abdelghany and Ahmad, 2002):

تعداد روزهای پرورش/۱۰۰×(ln وزن اولیه بدن - ln وزن نهایی بدن)= نرخ رشد ویژه

^{3}(میانگین طول نهایی بدن)/۱۰۰×میانگین وزن نهایی بدن= شاخص وضعیت

پروتئین مصرف شده/افزایش وزن=بازده پروتئین

افزایش وزن/غذای مصرف شده= ضریب تبدیل غذایی

به منظور سنجش و بررسی پاسخ ایمنی در پایان آزمایش نمونه برداری به عمل آمد. برای نمونه - برداری، ماهیان سریعاً در داخل محلول ۲ فنوکسی اتانول با غلظت ۰/۵ میلی لیتر به ازای هر لیتر آب قرار گرفتند و پس از بیهوشی اقدام به زیست سنجی ماهیان شد و سپس از ماهیان خونگیری شد. ابتدا به منظور مطالعات خون شناسی به تیوب های آغشته به هپارین به آزمایشگاه بخش هماتولوژی دانشگاه خلیج فارس بوشهر منتقل گردید و بلافاصله تعداد گلبول های سفید به وسیله لام هموسیتومتر نئوبار اندازه گیری شد. جهت تهیه پلاسما نمونه های خون ماهیان در دور ۱۶۰۰ گرانش و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند تا نمونه های پلاسما جمع آوری شوند (Webb *et al*., 2007). موکوس ماهیان جهت اندازه گیری فعالیت ضد باکتریایی جمع آوری شد. برای این کار ابتدا سه ماهی از هر تکرار برداشته شد و به مدت یک دقیقه در فسفات بافر نمکی ۱۰ میلی مول (PBS, pH 7.5, containing 115 mM NaCl) قرار داده شد و سپس موکوس از سطح پوست ماهیان به وسیله یک تکه پنبه استریل جمع آوری شد. موکوس های جمع آوری شده به میزان ۴ برابر با PBS رقیق شد و پس از به هم خوردن به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ گرانش و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند (Aranishi and Nakane, 1997). نمونه پلاسما و موکوس داخل فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. فعالیت لیزوزیم سرم بر اساس روش Kim و Austin (۲۰۰۶) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *میکروکوکوس لیزودیکتکوس* اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگاروز استفاده شد (Brata, 1993). برای این کار ابتدا آگاروز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (حاوی ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی مول کلرید کلسیم با pH= ۷/۲) تهیه شد. مقدار ۱×۱۰^{۸} گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۵- ۵۰ درجه سانتی گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول های قرمز خرگوش داخل پلیت ها توزیع گردید. پلیت ها به مدت یک شب

در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی متر و با فاصله ۲ سانتی متر از هم در آگارز ایجاد شد و در هر حفره میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت ها در محیط مرطوب و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط کش مخصوص اندازه گیری شد. ایمنوگلوبولین کل با روش Siwicki و همکاران (۲۰۰۴) اندازه گیری شد. در این روش گلوبولین ها با استفاده از محلول ۱۲ درصد پلی اتیلن گلیکول رسوب داده شد و بر اساس تفاوت محتوای پروتئین در طول موج ۵۹۰ نانومتر در قبل و بعد از ترسیب، میزان ایمنوگلوبولین کل محاسبه گردید. پروتئین کل بر اساس روش بیوره و با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی اندازه گیری شد. برای تعیین میزان ایمنی اختصاصی در ماهیان، فعالیت ضد باکتریایی پلاسما و موکوس بر علیه باکتری *Aeromonas hydrophila* به عنوان یک باکتری بیماری زای رایج در آبزی پروری براساس روش Rao و همکاران (۲۰۰۶) اندازه گیری شد.

در پایان آزمایش ۳ قطعه بچه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و آسان کشی شدند. بعد از خارج کردن امعاء و احشاء، لاشه ماهیان چرخ شده و تا زمان انجام آنالیزهای مربوطه (درصد رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آنالیزهای تقریبی ترکیب بیوشیمیایی جیره غذایی آزمایشی و لاشه با استفاده از روشهای استاندارد AOAC (۲۰۰۰) و حداقل با سه تکرار انجام شد. میزان رطوبت بوسیله خشک کردن نمونه ها در آون در دمای ^{o}C ۱۰۵ به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید. خاکستر بوسیله سوزاندن نمونه ها در کوره (Muffle furnace) در دمای ^{o}C ۵۵۰ به مدت ۱۲ ساعت محاسبه گردید. میزان پروتئین خام با ضرب محتوای نیتروژن نمونه در ضریب ۶/۲۵ و به روش کجلدال (دستگاه Buchi, Auto kejldahl K370) اندازه گیری و میزان چربی به روش سوکسله (دستگاه Buchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland; B-815 model) تعیین شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم های گوارشی در پایان آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در روی یخ و تحت شرایط استریل روده این ماهیان جدا و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. جهت استخراج عصاره آنزیمی، روده ماهی (گرم محتویات روده) را به نسبت ۵ : ۱ در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT 1300Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه هموژن شده و سپس هموژنات به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و سوپرناتانت حاصله در میکروتیوب ها جهت آنالیز آنزیم های مورد نظر تقسیم شده و تا زمان سنجش در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Moraiti-Ioannidou *et al.*, 2008). مقدار پروتئین محلول عصاره های آنزیمی با روش Bradford (۱۹۷۶) سنجش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از محلول سوبسترا آزوکازئین ۱/۵٪ در ۵۰ میلی مولار بافر Tris/Hcl در۷/۵ = pH صورت پذیرفت (Garcia-carreno *et al.*, 1993). فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از هیدرولیز p-nitrophenylemyristate و به طریق اسپکتروفتومتری سنجش گردید (Iijima, 1998). فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش Bernfeld (۱۹۹۵) و با استفاده از سوبسترای نشاسته سنجش گردید. نشاسته تحت تأثیر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در

معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می باشد.

برای بررسی وضعیت میکروبی روده ماهیان، در پایان دوره از هر تیمار بطور مجزا نمونه برداری صورت گرفت. برای این منظور بعد از حذف باکتریهای سطحی بدن با الکل ۷۰ درصد، روده ماهیان جدا شده و بعد از آن هموژن شدند. بعد از تهیه رقت های مورد نظر با استفاده از سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد نمک)، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت برروی پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری های اسید لاکتیک (MRS Agar) کشت داده شد. سپس پلیت های تهیه شده برای هر تیمار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور قرارداده شدند. در نهایت باکتریهای کشت شده براساس واحد CFU شمارش شدند (Ringo and Gatesoup, 1998).

تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version 15.1) تحت سیستم عامل Windows انجام گرفت. از آزمون Kolmogrove-Smirnove به منظور بررسی نرمال بودن داده ها و از آزمون لیون برای تعیین برابری واریانس ها استفاده شد. تفاوتهای احتمالی بین تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey بررسی شد. در همه آزمون های آماری سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

میزان بقای ماهیان در طول دوره در تمامی تیمارها ۱۰۰-۹۹ درصد بوده و دامنه تلفات بین ۱-۰ قطعه گزارش شد. نتایج مربوط به بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه و بار باکتریایی روده در جداول ۱ و ۵ ارائه شده است. وزن نهایی، شاخص، ضریب نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین هیچ اختلاف معنی‌داری در پایان آزمایش بین تیمارها نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$). همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می شود افزودن پروبیوتیک و سین بیوتیک به جیره وجود اختلاف معنی داری را بین تیمارهای مختلف غذایی و گروه شاهد نشان نداد ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۱: عملکرد رشد و تغذیه بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (گرم)	۷/۶۲±۰/۰۱^{a}	۷/۵۸±۰/۰۵^{a}	۷/۶۵±۰/۰۱^{a}	۷/۵۷±۰/۰۴^{a}
وزن نهایی (گرم)	۱۶/۰۶±۰/۲۶^{a}	۱۶/۷۰±۰/۴۲^{a}	۱۵/۹۷±۰/۰۲^{a}	۱۶/۵۶±۰/۴۵^{a}
نرخ رشد ویژه (٪ در روز)	۱/۸۶±۰/۰۴^{a}	۱/۹۷±۰/۰۷^{a}	۱/۸۴±۰/۰۱^{a}	۱/۹۵±۰/۰۸^{a}
شاخص وضعیت	۲/۳۹±۰/۲۰^{a}	۲/۴۵±۰/۱۱^{a}	۲/۴۲±۰/۲۰^{a}	۲/۳۸±۰/۰۷^{a}
غذاگیری روزانه (گرم)	۳۰/۶۵±۰/۸۵	۳۱/۶۱±۰/۷۶	۳۲/۱۵±۰/۶۶	۳۱/۹۲±۰/۲۸
ضریب تبدیل غذایی	۴/۲۰±۰/۱۳^{a}	۴/۱۷±۰/۱۴^{a}	۳/۹۶±۰/۱۲^{a}	۴/۰۵±۰/۱۳^{a}
ضریب کارایی پروتئین	۰/۵۱±۰/۰۳^{a}	۰/۴۷±۰/۰۱^{a}	۰/۴۵±۰/۰۱^{a}	۰/۴۹±۰/۰۱^{a}

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

نتایج مربوط به پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی تیمارهای مختلف در جدول ۲ آمده است. ایمنوگلوبولین کل، فعالیت لیزوزیم، فعالیت کمپلمان و تعداد گلبول های سفید اختلاف معنی داری را بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف غذایی نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$). فعالیت باکتری کشی موکوس نیز هیچ

اختلاف معنی داری را بین تیمار شاهد و تیمارهای سین بیوتیک و پروبیوتیک نشان نداد (نمودار۱، P >۰/۰۵). با این حال در جدول ۲ مشاهده می‌شود فعالیت باکتری کشی پلاسما به صورت معنی داری در تیمار شاهد پایین‌تر از تیمار ۳ (۱۰^{۶} CFU/gr ۱+ Pro درصد Pre) بود (P< ۰/۰۵).

نتایج مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان صبیتی در انتهای دوره پرورش در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۲: پاسخ ایمنی غیراختصاصی پلاسما بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
ایمنوگلوبولین کل (mg/ml)	۵/۳۹±۰/۴۹^{a}	۵/۷۴±۰/۶۴^{a}	۵/۵۰±۰/۳۵^{a}	۵/۵۵±۰/۱۲^{a}
فعالیت لیزوزیم پلاسما (µg/ml)	۲۶/۶۶±۱/۸۵^{a}	۴۰/۶۶±۷/۱۶^{a}	۳۵/۶۶±۲/۳۳^{a}	۴۰/۶۶±۱۲/۱۹^{a}
فعالیت کمپلمان پلاسما (شعاع هاله عدم رشد (mm^2))	۴۰/۲۶±۳/۳۹^{a}	۶۶/۶۵±۱۸/۲۷^{a}	۶۸±۱۹/۳۹^{a}	۴۳/۸۵±۱۷/۰۹^{a}
فعالیت باکتری کشی پلاسما (تعداد پرگنه‌های باکتری)	۱۷۴/۲۵±۹/۳۳^{a}	۱۹۵±۲۳/۵۵^{a}	۱۶۶/۵۰±۳۷/۶۹^{ab}	۶۷±۱۹/۶۷^{b}
فعالیت باکتری کشی موکوس (تعداد پرگنه‌های باکتری)	۲۵/۳۳±۶/۶۶^{a}	۲۸±۷/۲۳^{a}	۴۲/۳۳±۱۱/۴۶^{a}	۵۲±۱۱/۵۷^{a}
تعداد گلبول های سفید (mm^3)	۲۲۵۰±۱۴۴/۳^{a}	۲۰۰۰±۲۸۸/۶^{a}	۲۲۵۰±۱۴۴/۳^{a}	۴۲۵۰±۱۹۷/۳^{a}
لنفوسیت (٪)	۸۰±۵/۷۷^{a}	۸۷/۵۰±۴/۳۳^{a}	۷۰±۵/۷۷^{a}	۹۵±۰/۰۰^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

همچنان که در جدول مشاهده می شود میزان خاکستر و چربی لاشه اختلاف معنی داری را بین تیمارهای مختلف آزمایشی نشان نمی دهد (P ۰/۰۵ <). با این وجود میزان رطوبت لاشه در تیمار ۲ (۱۰^{۶} CFU/gr ۰/۵+ Pro درصد Pre) به صورت معنی داری بالاتر از گروه شاهد و تیمار ۱ (غذای شاهد+ ۱۰^{۶} CFU/gr Pro) بود (P <۰/۰۵). طبق نتایج بدست آمده میزان پروتئین لاشه به صورت معنی دار در تیمار شاهد بالاتر از تیمار ۲ بود (P <۰/۰۵).

نتایج مربوط به بررسی میزان فعالیت آنزیم های گوارشی در پایان آزمایش در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن پروبیوتیک به جیره سبب افزایش میزان فعالیت آلکالین پروتئاز در تیمار ۱ در مقایسه با تیمار شاهد و سایر تیمارها شد (P <۰/۰۵). علاوه بر این، میزان فعالیت آمیلاز در تیمار ۱ و ۳ به صورت معنی داری بالاتر از گروه شاهد و تیمار ۱ مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین میزان فعالیت لیپاز در تیمار ۳ به صورت معنی داری بالاتر از گروه شاهد و تیمار ۲ بود (P <۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که پس از ۴۲ روز تغذیه با پروبیوتیک (*L. plantarum*) و سین بیوتیک اختلاف معنی داری در شاخص های رشد و تغذیه ماهیان در مقایسه با گروه شاهد به وجود نیامد. بدین معنی که استفاده از پروبیوتیک و سین بیوتیک تغییری در وزن نهایی، شاخص وضعیت، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین بچه ماهیان صبیتی ایجاد نکرد.

جدول ۳: ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
پروتئین (درصد)	۱۹/۹۹±۰/۱۷^{a}	۱۹/۳۳±۰/۱۱^{ab}	۱۸/۳۸±۰/۵۵^{b}	۱۹/۳۱±۰/۳۹^{ab}
چربی (درصد)	۷±۰/۰۹^{a}	۷/۳۲±۰/۴۳^{a}	۶/۳۰±۰/۱۹^{a}	۶/۲۰±۰/۳۰^{a}
خاکستر (درصد)	۳/۹۹±۰/۱۳^{a}	۳/۳۱±۰/۲۱^{a}	۵/۱۹±۰/۸۹^{a}	۶/۷۳±۰/۰۵^{a}
رطوبت (درصد)	۶۶/۸۳±۰/۳۷^{a}	۶۷/۱۶±۰/۱۸^{a}	۶۹/۵۲±۰/۷۹^{b}	۶۷/۴۳±۰/۱۴^{ab}

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

جدول ۴: فعالیت آنزیم های گوارشی بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
آلکالین پروتئاز (U mg/protein)	۰/۴۷±۰/۰۵^{a}	۱/۱۴±۰/۰۶^{b}	۰/۵۵±۰/۱۴^{a}	۰/۵۳±۰/۰۴^{a}
آمیلاز (U mg/protein)	۱۷/۹۹±۱/۰۷^{a}	۳۳/۳۱±۱/۹۷^{b}	۱۶/۲۴±۱/۱۹^{a}	۲۴/۱۷±۱/۷۴^{c}
لیپاز (µmole/g/h)	۰/۰۱۷±۰/۰۰^{a}	۰/۰۲۴±۰/۰۰^{ab}	۰/۰۲۱±۰/۰۰^{a}	۰/۰۳۰±۰/۰۹^{b}

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

جدول ۵: تعداد کلونی های باکتری (Log CFU/g) بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
باکتری‌های اسید لاکتیک	۳/۰۵±۰/۱۹	۲/۴۶±۰/۱۱	۲/۹۰±۰/۲۸	۲/۷۲±۰/۱۴
باکتری‌های زنده	۲/۹۴±۰/۲۳	۲/۴۲±۰/۱۹	۲/۶۴±۰/۲۵	۲/۵۴±۰/۳۵

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

عدم وجود اختلاف معنی دار را می توان به کم بودن سطوح انتخابی پروبیوتیک و پربیوتیک جیره و متعاقب آن عدم توانایی ممانعت از تشکیل پرگنه‌های باکتری‌های بیماری زا توسط پرزهای گوارشی روده نسبت داد. در همین راستا Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر زایلواولیگوساکارید را در مدت ۴۵ روز بر عملکرد رشد ماهی حوض (*Carassius auratus gibelio*) مورد بررسی قرار داده و تاثیر معنی داری را مشاهده نکردند. Nekoubin و Sudagar (۲۰۱۲) با افزودن سین بیوتیک (Biomin IMBO) به جیره ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) مشاهده کردند که تفاوت معنی داری بین وزن نهایی و نرخ زنده ماندنی با گروه شاهد نداشت که با نتایج این تحقیق هم خوانی دارد. در مقابل Mehrabi و همکاران (۲۰۱۲) و Montajami و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که استفاده از سین بیوتیک (Biomin IMBO) در ماهی انگشت قد قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و سیچلاید گورخری (*Herichthys cyanoguttatus*) باعث افزایش در میانگین وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، راندمان تبدیل غذایی و میزان بقاء نسبت به گروه شاهد شد که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد. تناقض در نتایج بدست آمده توسط محققین در مطالعات مختلف ممکن است به علت اختلاف نوع و میزان پروبیوتیک و پربیوتیک مصرفی، درجه خلوص افزودنی ها، نوع جیره غذایی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، گونه ماهی و سن آن باشد (Merrifield *et al.*, 2010).

نتایج به دست آمده نشان داد که سین بیوتیک و پروبیوتیک جیره تاثیر معنی داری بر پاسخ ایمنی

غیراختصاصی ماهی صبیتی ندارد. در مطالعه حاضر میزان فعالیت کمپلمان و لیزوزیم ماهیان در تیمارهای مختلف سین بیوتیک اختلاف معنی داری نشان نداد، اما میزان آن در هر سه تیمار غذایی بالاتر از گروه شاهد بود. در مطالعه Ai و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد فروکتو اولیگوساکارید و $۱/۳۵*۱۰^{۷}$ CFU/gr و $۰/۴۲*۱۰^{۷}$ CFU/gr و Geng و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ماهی شوریده زرد (*Larimichthys crocea*) و سوکلا (*Rachycentron canadum*) گزارش کردند که میزان فعالیت کمپلمان و لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ترکیبی پروبیوتیک و پربیوتیک به طور معنی داری بالاتر از تیمار کنترل بود. میزان فعالیت لیزوزیم در کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) پس از تغذیه با سطوح ترکیبی پروبیوتیک ($۱۰^{۷}$ CFU/gr) و فروکتو اولیگوساکارید (۲/۵ گرم/کیلوگرم) و مانان اولیگوساکارید (۲/۵ گرم/کیلوگرم) اختلاف معنی داری با گروه شاهد نشان داد (Ye *et al*., 2011). در مطالعه حاضر میزان فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهیان به صورت معنی داری تغییر نکرد. با این حال فعالیت ضد باکتریایی پلاسما ماهیان در تیمار ۳ ($۱۰^{۶}$ CFU/gr + Pro ۰/۵ درصد Pre) نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافت که نشان دهنده تاثیر مثبت و سینرژیستی این دو مکمل در سطح ۰/۵ درصد پربیوتیک و $۱۰^{۶}$ CFU/gr پروبیوتیک بر فعالیت ضد باکتریایی پلاسما است. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه میزان فعالیت ضد باکتریایی پلاسما تیمار ۳ به صورت معنی داری بالاتر از تیمار ۱ ($Pro۱۰^{۶}$ CFU/gr) می باشد. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که استفاده از پربیوتیک و $۱۰^{۶}$ CFU/gr پروبیوتیک، به صورت ترکیبی، در مقایسه با کاربرد جداگانه آن ها مطلوب تر می باشد. خاصیت تحریک ایمنی در پروبیوتیک ها و پربیوتیک ها می تواند به تحریک رشد باکترهای مفید روده مانند باکتری های اسید لاکتیک و جنس باسیلوس نسبت داده شود، چراکه اجزاء دیواره سلولی این باکتری ها مانند لیپوپلی ساکاریدها فعالیت تحریک ایمنی را به واسطه تحریک تکثیر سلول های B، افزایش قدرت بیگانه خواری ماکروفاژها و افزایش مهاجرت ماکروفاژها دارا هستند؛ از این رو مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماری زا را موجب می شود (Ringø *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2012).

در مورد تاثیر افزودن پروبیوتیک و سین بیوتیک به جیره روی کیفیت لاشه آبزیان مطالعات زیادی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر مشاهده شد که سطوح پروبیوتیک (*L. plantarum*) به طور جداگانه و ترکیبی با پربیوتیک زایلواولیگوساکارید تاثیری بر روی کیفیت لاشه ماهیان ندارند. در همین راستا، Haghighi و همکاران (۲۰۱۰) تفاوت معنی داری را در استفاده از سطوح مختلف سین بیوتیک تجاری Biomin IMBO بر ترکیب لاشه بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*) مشاهده نکردند. Morshedi و همکاران (۲۰۱۵) اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک (*L. plantarum*) جیره را بر ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) مطالعه کردند. این محققین تفاوت معنی داری را از نظر میزان پروتئین، خاکستر و رطوبت بین تیمارهای مختلف آزمایشی با گروه شاهد مشاهده نکردند. با این حال، Rodriguez-Estrada و همکاران (۲۰۰۹) در قزل آلای رنگین کمان، Ye و همکاران (۲۰۱۱) در کفشک ماهی ژاپنی و Mehrabi و همکاران (۲۰۱۲) در قزل آلای رنگین کمان با افزودن سین بیوتیک نتایجی متضاد با تحقیق حاضر گزارش کردند. تضادی که بین مطالعات صورت گرفته در زمینه ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان وجود دارد ممکن است به عواملی از جمله تفاوت در سن، جنس، شرایط محیطی و فصل بستگی داشته باشد اما بدون شک اختلاف اصلی در ترکیب شیمیایی ماهی را باید در ارتباط با غذای دریافتی یا تغذیه ماهی و حتی درصد

و مقدار غذادهی روزانه دانست (Razavi-Shirazi, 2001). در مطالعه حاضر میزان پروتئین و رطوبت لاشه در تیمار ۲ به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش پیدا کرد. برخی محققین بر این باورند که تغییرات در ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهی مانند میزان پروتئین و چربی می تواند به تغییرات در تولید پروتئین و چربی در بدن، میزان ذخیره پروتئین و چربی در بافت های بدن و نرخ رشد متفاوت ماهی نسبت داد (Abdel-Tawwab *et al*., 2008; Heidarieh *et al*., 2012).

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تأثیر استفاده جدا از پروبیوتیک (*L. plantarum*) و هم زمان با پربیوتیک زایلوالیگوساکارید بر فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز، آمیلاز و لیپاز نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در تیمارهای ۱ (Pro$۱۰^{۶}$ CFU/gr) و ۳ ($۱۰^{۶}$ CFU/gr) Pro+ ۱ درصد Pre) نسبت به تیمار شاهد بود. تعدادی از محققین مطالعاتی را در مورد تأثیر جداگانه و ترکیبی پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک ها بر فعالیت آنزیم های گوارشی گونه‌های مختلف آبزی انجام داده اند از جمله Essa و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که با افزودن پروبیوتیک (*L. plantarum*) به جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) اختلاف معنی داری در فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید. افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک و پربیوتیک در تحقیقات مختلف گزارش شده است. Wang و Xu (۲۰۰۶) و Ye و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب با افزودن پروبیوتیک (*Bacillus* sp.) و سطوح ترکیبی پروبیوتیک (*B. clausii*) و فروکتو اولیگوساکارید و مانان اولیگوساکارید به جیره ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) و کفشک ماهی ژاپنی افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) را مشاهده کردند. همچنین، اضافه کردن پربیوتیک زایلوالیگوساکارید به جیره غذایی ماهی حوض افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در مقایسه با گروه شاهد موجب شد (Xu *et al*., 2009) که با یافته های تحقیق حاضر هم خوانی دارد. تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک ها فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری ها، بهبود تعادل میکروبی روده و در نتیجه بهبود هضم، جذب و شاخص های رشد را موجب می شوند (Suzer *et al*., 2008). موارد مشابهی از توانایی تولید آنزیم های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری های موجود در دستگاه گوارش ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al*., 2008)، هامور (*Epinephelus coioides*) (Sun *et al*., 2011) و شانک (*Sparus aurata*) (Suzer *et al*., 2008) گزارش شده است که همگی تأیید کننده نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم های گوارشی آلفا-آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز در بچه ماهیان صبیتی می‌باشد.

در مطالعه Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) و Burr و همکاران (۲۰۰۶) با تغذیه ماهیان قزل آلا و ماهی شوریده به ترتیب با پروبیوتیک (*L. rhamnosus*) و اثرات ترکیبی از مخمر آبجو، فروکتواولیگوساکارید (پربیوتیک) و محصول تجاری پربیوتیکی Grobiotic-A (ترکیب ایمونوژن با پربیوتیک Grobiotic-A ومخمر آبجو تقریباً مشابه است) گزارش کردند که میزان باکتری جدا شده از روده اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشت. نتایج مطالعات مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که پروبیوتیک (*L. plantarum*) و ترکیب آن با پربیوتیک زایلواولیگوساکارید نتوانسته مورد استفاده و تخمیر باکتری های اسیدلاکتیک قرا رگیرد و تعداد آنها را افزایش و در نهایت فلور روده را به سمت افزایش این باکتری ها سوق دهد، که ماحصل آن به شکل افزایش تعداد لاکتوباسیلوس ها خود را نشان دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات مکمل سازی جداگانه و ترکیبی پروبیوتیک با پربیوتیک جیره در مقادیر استفاده شده اثرات مثبتی بر عملکرد رشد، فلور باکتریایی روده و پاسخ ایمنی (به جز فعالیت باکتری کشی پلاسما) ماهی صبیتی ندارد اما فعالیت آنزیم های گوارشی را بهبود می بخشد. به طور کلی می توان بیان کرد که استفاده جداگانه و هم زمان از پروبیوتیک (*L. plantarum*) و پربیوتیک زایلوالیگوساکارید در بچه ماهی صبیتی با وزن استفاده شده در تحقیق حاضر و شرایط محیطی حاکم نمی تواند محرک مناسبی باشد و استفاده از این افزودنی ها در غلظت های استفاده شده برای ماهی صبیتی توصیه نمی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند از جناب آقای مهندس نجف آبادی رئیس ایستگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی و سایر پرسنل محترم این مجموعه به جهت همکاری در مراحل عملی و آزمایشگاهی نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

Abdelghany, A. E., Ahmad, M. H., 2002. Effects of feeding rates on growth and production of Nile tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. Aquaculture Research 33: 415– 423.

Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, M.A., Nahla-Ismael, E.M., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 280:185–189.

Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Zhang, W., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*.
Aquaculture 317: 155-161.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Association of Official Analytical Chemists, 16th (end), Procedure 984. 25.

Aranishi, F., Nakane, M., 1997. Epidermal protease of the Japanese eel. Fish Physiology and Biochemistry 16: 471-478.

Barta, O., 1993. Veterinary clinical immunology laboratory, Bar- Lab Inc, Vol2, Section 3: 24-25.

Bernfeld, P., 1995. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O (Eds), Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Pp. 149-158.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

Burr, G., Hume, Ricke., Gatlin, D., 2006. Evaluation of Grobiotic-A, Brewer yeast and Fructo- oligosaccharide as Prebiotic for the Red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture America 2006-Meeting Abstract.

Essa, M.A., El-Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboo, S.M., Esmael, N.A., Lall, S.P., 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the Arabian Aquaculture Society 5: 143-162.

FAO., 2015. Fish Stat Plus datasets. Fishery statistical collections: Aquaculture Production (1950–2013; released March 2015). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fatemi, S.A., Mirzargar, S.S., 2007. Applied Fish Pharmacology. Tehran University Press. 123p.

Garcia-Carreno, F.L., Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in Langostilla *Pleuroncodes planipes* and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. Journal of Food Biochemistry 17: 97-113.

Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., Liu, X.Q., 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron*

canadum. Fish and Shellfish Immunology 31: 400-406.

Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of Aeromonas media on the pacific oyester, *Crassostrea gigas*, when challenged with vibrio tubiashii. Aquaculture 169: 111-120.

Haghighi, D.T., Fallahi, M., Abdollahtabar, Y., 2010. The effect of different levels of Biomin Imbo synbiotic on growth and, survival of *Rutilus frisii kutum* fry. Journal of Fisheries 4(3): 1-15.

Heidarieh, M., Mirvaghefi, A. R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A. A., Behgar, M., 2012. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry 38: 1169–1174.

Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancrease of red sea bream *Pagarus major*. Fish Physiology and Biochemistry 18: 59-69.

Jenabi Haghparast, R., Meshkini, S., Tukmechi, A., 2014. Effects of bactocell probiotic and manan peribiotic on growth and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research 68(4): 375-382.

Kim, D., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology 21: 513-524.

Marcouli, P. A., Alexis, M. N., Andriopoulou A., Georgudaki J., 2006. Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture Nutrition 12: 25-33.

Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Jafarpour, A., 2012. Effects of dietary supplimantation on growth, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96(3): 474-81.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex M., Ringo, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302: 1-18.

Montajami, S., Hajiahmadyan, M., Forouhar Vajargah, M., Hosseini Zarandeh, A.S., Shirood Mirzaie, F., Hosseini, S.A., 2012. Effect of synbiotic (Biomin imbo) on growth performance and survival rate of Texas cichlid (*Herichthys cyanoguttatus*) larvae. Global Veterinaria 9 (3):
358-361.

Moraiti-Ioannidou M., Castritsi-Catharios J., Miliou H., 2008. Biochemical composition and digestive enzyme activity during naupliar development of *Artemia* spp. from three solar saltworks in Greece. Aquaculture 286: 259-265.

Nekoubin, H., Sudagar, M., 2012. Assessment of the Effects of Synbiotic (Biomin imbo) via Supplementation with Artificial Diet (With Different Protein Levels) on Growth Performance and Survival Rate in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). World Journal of Zoology 7 (3): 236-240.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198: 229–236.

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

Rao, Y. V., Das, B. K., Jyotyrmayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 20(3): 263-273.

Ringo, E., Gatesoupe, F. J., 1998. Lactic acid bacteria in fish, a review. Aquaculture 160: 177-203.

Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.Ø., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G-I., Bakke, A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition 16: 117-136.

Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Suisanzoshoku 57: 609-617.

Morshedi, V., Nafisi Bahabadi, M., Azodi, M., Modaresi, M., Cheraghi, S., 2015. Effects of dietary probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on body composition, serum biochemical parameters and liver enzymes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*, Bloch 1790). Journal of Marine Science and Technology 14(2): 1-14.

Paricheh, N., Jafaryan, H., Harsij, M., Ahmadi, A.R., Sahandi, J., 2016. Effects of Bacillus probiotic enzyme extract on growth and carcass biochemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Journal of Marine Science and Technology 15(3): 1-10.

Razavi-Shirazi, H., 2001. Seafood technology. Naghshe Mehr Publication. 292p.

Pouramini, M., Hosseinifar, H., 2007. Application of probiotics and probiotics in aquaculture. Moje Sabze Publication. 104p.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92.

Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Rumsey, G. L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary lmmunology and lmmunopathology 41: 125-139.

Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., Skrupskelis, K., 2008. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. Fisheries Science 74(6): 1307–1314.

Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, CH., 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 Immunol 26(5): 691-698.

Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Song, K., Li, J.S., 2011. Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture Nutrition 165: 1-9.

Suzer, C., Coban, D., Kamaci H.O., Saka, S., Firat, K., Otgucuoğlu, O., 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.

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

Wang, Y.B., Xu, Z., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology 127: 283-292.

Webb, M. A. H., Allert, J. A., Kappenman, K. M., Marcos, J., Feist, G. W., Schreck, C. B., Shackleton, C. H., 2007. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology 154: 98-104.

Xu, B., Wang, Y., Li, J., Lin, Q., 2009. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish Physiology and Biochemistry 35: 351–357.

Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D., Sun, Y.Z., 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquacultur Nutrition 17: 902-911.

Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., Xu, D., 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 33: 1027-1032.

Ziemer, C.J., Gibson, G.R., 1998. An overview of probiotcs, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. International Dairy Journal 8: 473–479.

Effects of Single and Combined Supplementation of *Lactobacillus plantarum* with dietary xylooligosaccharide on growth performance, body composition and physiological responses of sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling

Morshedi, Vahid [1,2]. Agh, Naser [*1]. Marammazi, Jasem [3]. Noori, Farzane [1]. Mohamadian, Takavar [4]

1. Department of Aquaculture of Artemia and Aquaculture Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Persian Gulf Institute, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran
3. South Iranian Aquaculture Research Center, Ahwaz, Iran
4. Department of Aquatic Health of Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of ahvaz, ahvaz, Iran

Abstract

The aim of this study was to evaluate the single and combined effects of dietary probiotic with prebiotic on growth performance, non-specific immune response, body composition, digestive enzymes activity and intestine bacterial flora of sobaity fingerling (*Sparidentex hasta*). For this purpose, 425 individuals of sobaity fingerlings were prepared with an average weight of 7.64 ± 0.3 g from the Mariculture Research Station of South Iranian Aquaculture Research Center. This study was carried out in a completely randomized design with four treatments and three replications (45 fish per each replication) in fiberglass tanks with 300 liters volume. Fish were fed with feed containing 0 (control group), 10^6 CFU probiotic per gram feed (treatment 1), 0.5 and 1 percent prebiotic plus10^6 CFU probiotic per gram feed (treatment 2 and 3) at 4.5 percent of body weight for a period of 42 days. At the end of the experiment, body composition, intestine, blood, plasma and mucus samples were collected. The obtained results indicated that dietary prebiotic and probiotic did not change growth performance, intestine bacterial flora and non-specific immune response of sobaity ($P > 0.05$). Nonetheless, plasma bactericidal activity of control group was significantly higher that treatment 3 ($P < 0.05$). Moisture and protein content of treatment 2 showed significant different compared to the control group ($P < 0.05$). The results of this study showed that digestive enzymes activity including alkaline protease, amylse and lipase affected by administration of dietary prebiotic and probiotic ($P < 0.05$). Overall, this study showed that single supplementation of probiotic and combination with prebiotic at the used amounts had no positive effects on growth performance and intestine bacterial flora and immune response (except plasma bactericidal activity) of sobaity but improve digestive enzymes activity.

Keywords: Probiotic, Innate immunity, Body composition, Digestive enzymes, Sobaity (*Sparidentex hasta*).

Table 1. Growth and feeding performance of sobaity juvenile according to the different treatments at the end of the experiment (mean ± SE)
Table 2. Non-specific immune responses of sobaity juvenile according to the different treatments at the end of the experiment (mean ± SE)
Table 3. Body composition of sobaity juvenile according to the different treatments at the end of the experiment (mean ± SE)
Table 4. Digestive enzyme activity of sobaity juvenile according to the different treatments at the end of the experiment (mean ± SE)
Table 5. Total colony bacteria counts of sobaity juvenile according to the different treatments at the end of the experiment (mean ± SE)

Corresponding author E-mail: n.agh@urmia.ac.ir