

اثرات بکارگیری منفرد و توأم لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) و فرمیک اسید بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ایمنی و مقاومت در برابر باکتری *Aeromonas hydrophila* در گورخر ماهی (*Danio rerio*)

ابوالفضل رزاق پور، سمیه بهرام*، سید روح‌الله جوادیان

گروه شیلات، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۰

چکیده

مطالعه حاضر اثر استفاده از منفرد و توأم *Lactobacillus rhamnosus* (LR) و فرمیک اسید (FA) بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ایمنی و مقاومت در برابر باکتری *Aeromonas hydrophila* در گورخر ماهی (*Danio rerio*) مورد بررسی قرار داد. به این منظور ۲۴۰ قطعه گورخر ماهی با میانگین وزن $68/2 \pm 2/4$ میلی‌گرم در ۱۲ اکواریوم با تعداد ۲۰ ماهی در هر اکواریوم توزیع شدند و با چهار جیره آزمایشی شامل: تیمار اول، جیره پایه (صفر درصد افزودنی، T0)، تیمار دوم با 1×10^8 CFU پروبیوتیک LR (T1)، تیمار سوم با $0/3$ درصد FA (T2) و تیمار چهارم با 1×10^8 CFU پروبیوتیک LR و $0/3$ درصد FA (T4) به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نتایج نشان داد که تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و میزان بازماندگی معنای دار بود به طوری که ماهیان تغذیه شده با باکتری LR و FA (T1، T2 و T3) وزن نهایی بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$). اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد و T3 دارای بیشترین فعالیت بود ($P < 0/05$). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در لیپوزیم مشاهده شد، به طوری که بالاترین میزان در تیمارهای تغذیه شده با LR و FA (T1، T2 و T3) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$). بعد از مواجهه با باکتری *A. hydrophila* به مدت ۱۴ روز کمترین نرخ مرگ و میر در تیمارهای تغذیه شده LR و FA به دست آمد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از مکمل‌های *L. rhamnosus* و فرمیک اسید در جیره غذایی گورخر ماهی می‌تواند بر رشد و سلامت آن اثرات مثبتی بگذارد.

کلید واژگان: *Lactobacillus rhamnosus*، فرمیک اسید، گورخر ماهی، ایمنی، آنزیم

مقدمه

در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی با منشاء طبیعی به دلیل در دسترس بودن، خطرات کمتر برای محیط زیست و آبی و همچنین قیمت پایین تر افزایش داده است (Dugenci *et al.*, 2003). به همین دلیل استفاده از محرک ایمنی و رشد مانند پروبیوتیک‌ها (Mehrabi *et al.*, 2018)، اسیدهای آلی و ترکیبات مشتق شده از گیاهان مانند پلی فنول‌ها (Moustafa *et al.*, 2019) به دلیل افزایش رشد و جلوگیری از بروز بیماری‌های عفونی به جای آنتی بیوتیک‌ها مطرح می‌باشند (Austin *et al.*, 2006).

پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش به عنوان باکتری‌های مفیدی که دارای توانایی‌های از جمله ایجاد تعادل بین سیستم ایمنی بدن و دستگاه گوارش است، شناخته شده‌اند. پروبیوتیک‌ها در صورت مصرف به میزان مشخص، دارای اثرات مفیدی بر مصرف کننده می‌باشند. همچنین دارای خواص تحریک کنندگی و تقویت کنندگی بر سیستم ایمنی هستند (یزدی و همکاران، ۱۳۸۸). لاکتوباسیلوس رامنوسوس یک باکتری پروبیوتیک است که اثرات بالقوه آن بر رشد ماهی مورد مطالعه قرار گرفته است. پروبیوتیک‌ها برای بهبود سلامت روده و جذب مواد مغذی در حیوانات از جمله ماهی شناخته شده‌اند. چندین مطالعه تأثیر لاکتوباسیلوس رامنوسوس را بر رشد ماهی بررسی کرده‌اند که نتایج امیدوارکننده بوده است. به عنوان مثال، ضیایی نژاد و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که مکمل غذایی لاکتوباسیلوس رامنوسوس باعث بهبود عملکرد رشد و کارایی تغذیه در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌شود. به طور مشابه، Nayak (۲۰۱۰) نشان داد که پروبیوتیک‌های مبتنی بر لاکتوباسیلوس رشد و بقای کپور ماهی هندی را افزایش می‌دهند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس رامنوسوس ممکن است با استفاده بهتر از مواد مغذی و سلامت کلی، تأثیر مثبتی بر رشد ماهی داشته باشد.

از مکمل‌های دیگری که در آبی پروری قابلیت استفاده دارد می‌توان به اسیدهای آلی از جمله فرمیک اسید اشاره نمود. فرمیک اسید که با نام متانوئیک اسید نیز شناخته می‌شود، یک اسید آلی ساده با فرمول شیمیایی HCOOH است. به عنوان یک افزودنی غذایی و محرک ایمنی در آبی پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از این اسید در تغذیه آبیان به ویژه در پرورش ماهی و میگو مفید است. این مکمل‌های خوراکی علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد، منجر

امروزه یکی از اصلی‌ترین دغدغه‌های تولیدکنندگان و فعالان عرصه پرورش دام، طیور و آبیان تأمین نیاز انسان به غذا و مواد مغذی با کیفیت می‌باشد. یکی از منابع مهم تأمین غذای جمعیت جهان، استفاده از منابع اقیانوس‌ها، دریاها و آب‌های داخلی کشورها می‌باشد که با توجه به اصل حداکثر استفاده معقول از منابع طبیعی با رعایت اصل حفظ ذخایر آبیان و تأمین تداوم استفاده از آن‌ها، نیاز اساسی به توسعه صنعت پرورش ماهی و سایر آبیان دریایی می‌باشد (Ahmad, 2013). در چند دهه گذشته، سهم صنعت آبی پروری در تولید غذاهای جهانی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است که تقریباً نیمی از غذاهای مصرفی انسان را تأمین می‌کند (Guardiola *et al.*, 2016). ولی در کنار این رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی روبه‌رو بوده که از جمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد به گونه‌ای که شیوع بیماری‌ها به عنوان مشکل عمده آبی پروری، توسعه اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورها تحت تأثیر قرار داده است (Lee *et al.*, 2000). بین عوامل مسبب بیماری‌های باکتریایی، آئروموناس‌های متحرک به خصوص آئروموناس هیدروفیلا بسیار مورد توجه می‌باشد (Lee *et al.*, 2000). آئروموناس‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبتی هستند که از دو گروه مجزای غیر متحرک سرمادوست و گروه متحرک مزوفیلیک تشکیل شده‌اند. محیط‌های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری‌های آئروموناس، مورد توجه هستند و ماهی را به عنوان منبع اصلی این میکروارگانیسم‌ها معرفی می‌کنند (Swaminathan *et al.*, 2004).

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها متداول‌ترین روش درمانی برای عفونت‌های باکتریایی در آبیان است که مشکلات مختلفی را به همراه دارد. مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها که ناشی از مصرف بی‌رویه داروها، خود درمانی و تجویز آنتی بیوتیک توسط افراد غیر متخصص است، به عنوان یکی از معضلات مهم صنعت آبی پروری مطرح می‌باشد. عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن و حاد، اثرات جانبی مضر داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها و مقاومت روز افزون باکتری‌های مختلف در برابر برخی از داروها به ویژه آنتی بیوتیک‌های رایج، گرایش محققین را نسبت به مطالعه

هفته، آکواریوم‌ها به چهار تیمار آزمایشی با سه تکرار اختصاص داده شدند و در طول دوره آزمایش در این مطالعه، ماهی‌ها در ابتدا با نرخ تغذیه ۳۰ گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز با جیره پایه (T0)، فرمیک اسید (T1)، پروبیوتیک LR (T2) و FA+پروبیوتیک LR (T3) تغذیه شدند. تا پایان آزمایش تغذیه، ماهی‌ها هر ۲ هفته یک بار وزن شدند تا تغذیه در طول مطالعه تنظیم شود (Ahmadifar et al., 2019). سیستم پرورشی با هوادهی ثابت با استفاده از سنگ هوا بود و روزانه (۷۰ درصد) با آب تازه مبادله می‌شد. در طول دوره آزمایشی، پارامترهای شیمیایی و فیزیکی آب از جمله دما، اکسیژن محلول و pH آب به ترتیب $25/3 \pm 0/7$ درجه سانتی‌گراد، $7/13 \pm 0/14$ میلی‌گرم در لیتر و $7/5 \pm 0/8$ بود.

عملکرد رشد: در ابتدا و انتهای آزمایش تغذیه، تمام ماهی‌های موجود در هر مخزن بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی صید شدند و پس از بیهوشی در حمام روغن میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر، Ahmadifar et al., 2019) به صورت جداگانه وزن شدند. وزن نهایی، افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و نرخ بازماندگی براساس فرمول محاسبه شد (Ahmadifar et al., 2019).

افزایش وزن (میلی گرم) = وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

نرخ رشد ویژه = [لگاریتم طبیعی وزن نهایی - لگاریتم طبیعی وزن اولیه / طول دوره (۶۵ روز)] $\times 100$

ضریب تبدیل غذایی = غذای دریافتی (گرم) / وزن به دست آمده (گرم)

نمونه‌برداری بافت: پس از اندازه‌گیری بیومتریکی، ۹ قطعه ماهی به صورت تصادفی صید و با روغن میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر، Ahmadifar et al., 2019) بیهوش شده و سر و باله‌ها خارج شدند. نمونه‌های ماهی در نیتروژن مایع منجمد شدند و به صورت جداگانه با هموزنایزر دستی در بافر ۲۵ میلی مولار (pH 7.2) Tris-HCl همگن شدند و برای سنجش فاکتورها استفاده شدند.

سنجش فاکتورهای ایمنی: فعالیت لیزوزیم در هموزن کل بدن براساس مطالعه قبلی تعیین شد (شیخ زاده و همکاران، ۲۰۱۲). سوسپانسیون باکتری *Micrococcus luteus* در بافر فسفات سیترات (۷۵ میکرولیتر) با هموزنات کل بدن (۲۵ میکرولیتر) مخلوط شد و جذب به‌طور مداوم در ۴۵۰

به تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی، افزایش تحمل تنش‌های محیطی و مقاومت در برابر برخی بیماری‌های عفونی آبیان می‌گردند، که همه این عوامل در نهایت منجر به اقتصادی‌تر شدن تولید آبیان پرورشی می‌گردد (Rao et al., 2006).

ماهی زبرا با نام علمی *Danio rerio* متعلق به راسته کپورماهی شکلان و خانواده Danionidae است که یک گونه مناسب برای تحقیق می‌باشد. با توجه به خواص پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی، تحقیق حاضر به بررسی اثر جیره حاوی فرمیک اسید و پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر بازدهی رشد، آنزیم‌های گوارشی و مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا در گورخر ماهی (*Danio rerio*) پرداخت.

مواد و روش‌ها

جیره‌های آزمایشی: برای تهیه تیمارها، ابتدا جیره غذایی پایه بیومار با آب مقطر مخلوط شد و بعد از تبدیل شدن به صورت خمیر، مکمل‌های مد نظر به آن اضافه شدند، سپس با استفاده از چرخ گوشت صنعتی خوراک به صورت رشته تبدیل گردید. با بررسی منابع صورت گرفته سطوح افزودنی‌ها تعیین شد و چهار تیمار با سطوح شاهد با جیره پایه (بدون افزودنی)، تیمار دوم با 1×10^8 CFU پروبیوتیک LR (Xia et al., 2018)، تیمار سوم با ۰/۳ درصد FA (Torrecillas et al., 2024) و تیمار چهارم با 1×10^8 CFU پروبیوتیک LR و ۰/۳ درصد FA آماده شدند. پلت‌های غذایی با ژلاتین آبی دو درصد پوشش داده شدند و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس بسته‌بندی، کدگذاری و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ماهی و شرایط پرورش: ۲۴۰ قطعه گورخر ماهی ۴۰ روزه سالم (Tuebingen strain) با میانگین وزن $68/2 \pm 2/4$ میلی‌گرم از مؤسسه رویان (تهران، ایران) تهیه و به مرکز تکثیر ماهیان زینتی واقع در قائمشهر منتقل شد. ماهی‌ها در ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای (۴۰ لیتر) با تراکم ۲۰ ماهی در هر آکواریوم توزیع شدند و به مدت ۲ هفته به شرایط آزمایش سازگار شدند و در طول دوره سازگاری با جیره پایه (بایومار، پروتئین ۵۴ درصد، چربی ۱۸ درصد، ماده خشک ۹۲ درصد و خاکستر ۷/۹ درصد) دو بار در روز تغذیه شدند بعد از دو

جدول ۱- عملکرد رشد ماهیان تغذیه شده با جیره های آزمایشی

T ₃	T ₂	T ₁	T ₀	تیمارها
۶۸/۳۳±۲/۱۲ ^a	۶۷/۴۴±۳/۲۸ ^a	۶۹/۱۱±۲/۲۵ ^a	۶۸/۰۰±۲/۴۱ ^a	وزن اولیه (میلی گرم)
۱۹۱/۲۲±۴/۰۴ ^c	۱۸۸/۱۱±۳/۹۶ ^{bc}	۱۷۳/۶۷±۳/۰۸ ^{ab}	۱۶۸/۱۱±۳/۲۰ ^a	وزن نهایی (میلی گرم)
۱۲۲/۸۹±۳/۴۴ ^b	۱۲۰/۶۷±۲/۱۱ ^b	۱۰۴/۵۶ ± ۳/۱۳ ^a	۹۶/۱۱±۲/۰۶ ^a	افزایش وزن (میلی گرم)
۱/۸۴±۰/۰۵ ^b	۱/۸۴±۰/۰۶ ^b	۱/۶۵±۰/۰۵ ^{ab}	۱/۵۷±۰/۰۴ ^a	نرخ رشد ویژه (%/روز)
۱/۸۷±۰/۰۵ ^a	۱/۹۱±۰/۰۳ ^a	۲/۲۰±۰/۰۶ ^a	۲/۴۰±۰/۰۵ ^a	ضریب تبدیل خوراک
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	نرخ بازماندگی (%)

حروف انگلیسی در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها با استفاده از آزمون توکی است.

شد.

چالش با باکتری *A. hydrophil*: در پایان ۸ هفته دوره تغذیه، ۱۰ عدد ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب شده و به آکواریوم های دیگر انتقال یافتند. سپس با باکتری *A. hydrophila* با غلظت 1×10^6 CFU غوطه ور شدند. در طی این دوره، تغذیه ماهیان قطع شد و مرگ و میر ماهیان تا پایان روز ۱۴ پس از غوطه وری با باکتری ثبت گردید (Rashidian et al., 2021).

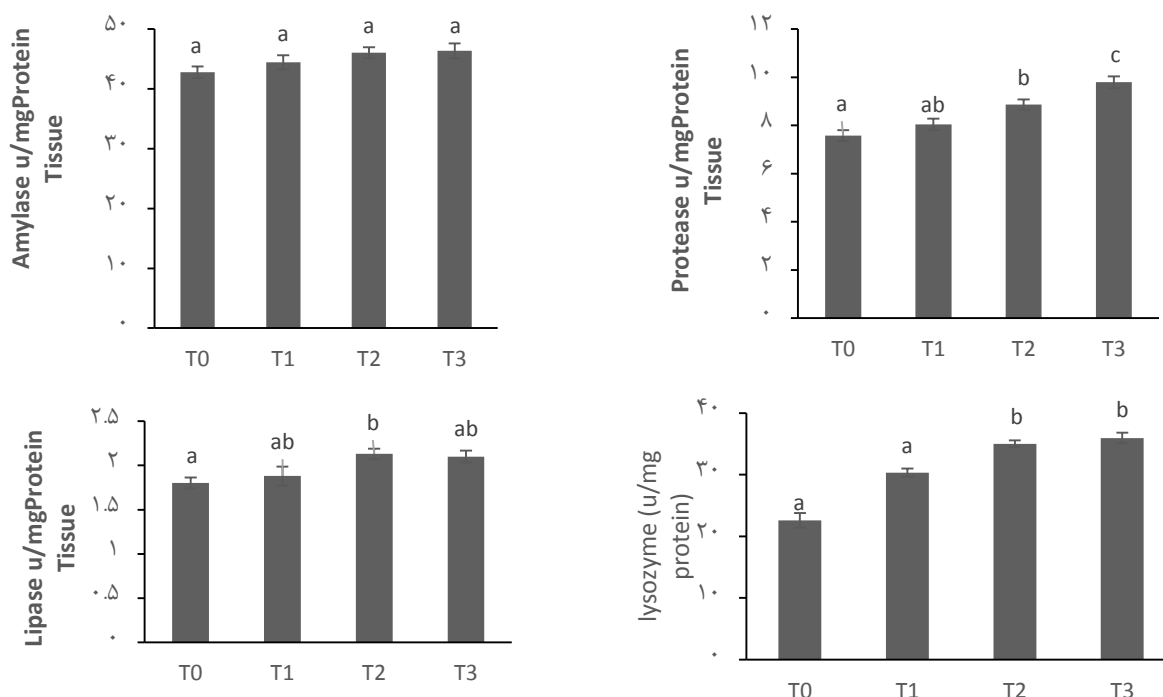
آنالیز آماری: برای بررسی آماری داده ها، ابتدا نرمال بودن آنها توسط آزمون Kolmogrov-Smirnov ارزیابی و همگنی واریانس ها با آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت با برقراری شرایط فوق، جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و اختلاف میانگین ها به وسیله آزمون توکی در سطح معنی داری $P < 0.05$ بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS (version 20.0) انجام شد و شکل ها در نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ رسم گردید. داده ها در متن به صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شدند.

نتایج

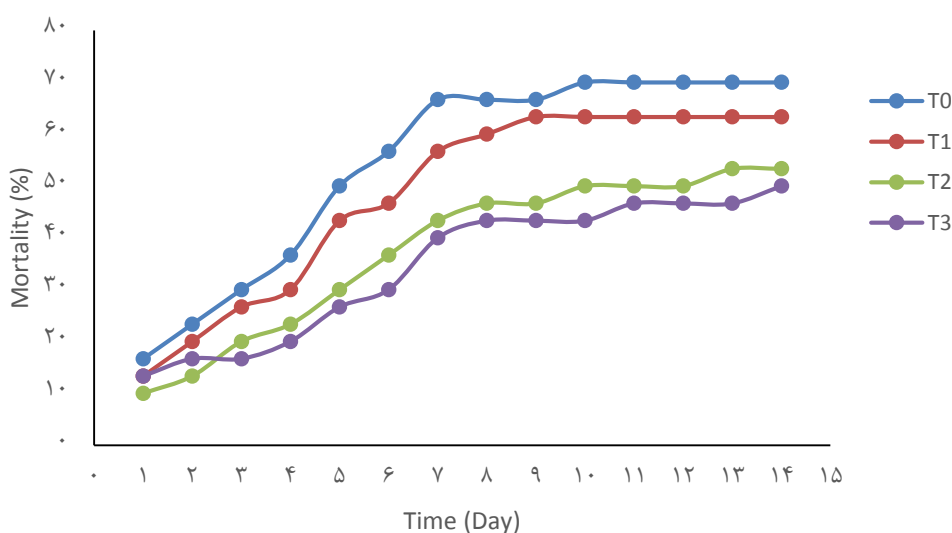
عملکرد رشد: نتایج مربوط به عملکرد رشد گورخر ماهی تغذیه شده با جیره های آزمایشی نشان داد که استفاده از فرمیک اسید و پروبیوتیک LR هم به صورت جداگانه (T₁ و T₂) و هم به صورت ترکیب (T₃) سبب افزایش معنی داری در فاکتورهای رشد از جمله وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه شده است (جدول ۱، $P < 0.05$). اثر معنی داری در ضریب تبدیل غذایی بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱، $P > 0.05$).

نانومتر برای ۵ دقیقه ثبت شد. سطح آنتی بادی کل در هموژنات کل بدن براساس مطالعه قبلی تعیین شد (Siwicki et al., 1995). برای محاسبه سطح آنتی بادی در هموژن ها، محتوای پروتئین کل در هموژنات کل بدن قبل و بعد از رسوب مولکول های آنتی بادی با پلی اتیلن گلیکول (۱۲ درصد) ارزیابی شد.

سنجش آنزیم های گوارشی: پروتئین محلول در هر هموژن ماهی براساس روش Bradford (۱۹۷۶) با محلول آلبومین سرم گاوی به عنوان محلول استاندارد تعیین شد. روش Brenfeld (۱۹۹۵) برای تشخیص فعالیت آمیلاز استفاده شد. به طور خلاصه، نمونه ها (۵۰ میکرولیتر) با محلول نشاسته (۲۵۰ میکرولیتر) ترکیب شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از آن، مخلوط با یک درصد دینیترو سالیسیلیک اسید (۰/۵ میلی لیتر) مخلوط شد و در معرض جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای ارزیابی فعالیت لپاز، هموژنات ماهی (۲۰ میکرولیتر) با p-نیتروفنیل بوتیرات (۵۰ میلی مولار، ۶۰ میکرولیتر)، بافر Tris-HCl و اتانول ۴ درصد، ۱ میلی لیتر مخلوط شد و سپس جذب به طور مداوم در طول موج ۴۰۵ نانومتر به مدت ۵ دقیقه خوانش شد. فعالیت پروتئاز براساس دستورالعمل شیخ زاده و همکاران (۲۰۱۲) اندازه گیری شد. هموژنات ها به طور جداگانه، در حجم های برابر، با ۱۰۰ میلی مولار بافر بی کربنات آمونیوم با ۰/۷ درصد آزوکائین (pH ۷/۸) روی شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۹ ساعت انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm، ۴/۶ درصد تری کلرواستیک اسید برای پایان دادن به واکنش افزوده شد. سوپرناتانت با ۰/۵ میلی متر سدیم هیدروکسید درون میکروپلیت های کف تخت مخلوط و چگالی نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری



شکل ۱- فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ایمنی در گورخر ماهی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی



فعالیت لیپوزیم بافت بین تیمارهای مختلف مشاهده شد ($P < 0.05$) و بالاترین میزان در ماهی‌هایی که از فرمیک اسید و پروبیوتیک LR هم به صورت جداگانه (T1 و T2) و هم به صورت ترکیب (T3) تغذیه کردند، به دست آمد. **چالش با باکتری *A. hydrophila***: نتایج درصد نسبی بقاء در گورخر ماهی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از چالش با *A. hydrophila* در جدول ۲ و شکل ۲ ارائه شده است. در بررسی چالش با *A. hydrophila* نیز، گروه T3 به صورت معنی‌داری ($P < 0.05$) سبب افزایش نرخ بقاء و کاهش نرخ مرگ و میر نسبت به سایر گروه‌ها گردید.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های ایمنی: فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فاکتورهای ایمنی در گروه‌های مختلف در شکل ۱ گزارش شد. اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی در میزان فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده نشد ($P > 0.05$). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد و بالاترین سطح فعالیت در این آنزیم‌ها در ماهی‌هایی که از فرمیک اسید و پروبیوتیک LR هم به صورت جداگانه (T1 و T2) و هم به صورت ترکیب (T3) تغذیه کردند، به دست آمد ($P < 0.05$). اختلاف معنی‌داری در

جدول ۲- میزان مرگ و میر، بقا و درصد نسبی بقا (RPS) گورخر ماهی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی به مدت ۸ هفته و چالش با باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* به مدت ۱۴ روز

T ₃	T ₂	T ₁	T ₀	تیمارها
۵۰/۰ ^a	۵۳/۳۳ ^{ab}	۶۳/۳۳ ^{bc}	۷۰/۰ ^c	نرخ مرگ و میر (%)
۵۰/۰ ^c	۴۶/۶۷ ^{bc}	۳۶/۶۷ ^{ab}	۳۰/۰ ^a	نرخ بازماندگی (%)
۲۸/۵۷	۲۳/۸۱	۹/۵۲	-	RPS

حروف انگلیسی در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با استفاده از آزمون توکی است.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از افزودنی‌های خوراکی به‌عنوان محرک ایمنی یک رویکرد سازگار با محیط‌زیست برای القای ایمنی و سلامتی در آبزیان است (Wang et al., 2016). در این مطالعه حاضر اثرات فرمیک اسید و پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر بازدهی رشد، آنزیم‌های گوارشی و مقاومت در برابر *اثرموناس هیدروفیلا* در گورخر ماهیمورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، استفاده از فرمیک اسید و پروبیوتیک LR اثر معنی‌داری بر فاکتورهای رشد داشت و وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی فرمیک اسید و پروبیوتیک LR بیشتر از گروه کنترل بود. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، چندین مطالعه اثر مثبتی را در اثر استفاده مکمل‌های غذایی بر رشد ماهی را گزارش دادند (Safari et al., 2017; Hoseinifar et al., 2023). به‌طور مشابه، اسیدها یا نمک‌های آلی کارایی رشد را در ماهی تیلاپیا نیل، *Oreochromis niloticus* (Reda et al., 2020; Hassan et al., 2020) و قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* بهبود می‌بخشند (De Wet, 2005). همچنین، افزایش رشد در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های مکمل شده با پروبیوتیک در کپور معمولی *Cyprinus carpio* (Mohammadian et al., 2022) و قزل‌آلای رنگین کمان (محمدی و توکمه‌چی، ۱۳۹۴) تأثیر استفاده توام نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر شاخص‌های رشد و تجمع پروبیوتیک در روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۰(۱): ۵۳-۴۷، گزارش شد. بهبود رشد از طریق اسیدهای آلی و پروبیوتیک‌ها به چند طریق امکان‌پذیر است که می‌توان به کاهش pH معده که به‌نوبه خود باعث افزایش فعال شدن پپسین می‌شود، کاهش pH روده، که به‌طور بالقوه منجر به افزایش انحلال مواد معدنی و متعاقب آن افزایش جذب توسط اسیدهای آلی

می‌شود (Hassan et al., 2020) و بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی توسط پروبیوتیک‌ها اشاره کرد (Dawood et al., 2016).

آنزیم‌های گوارشی نقش کلیدی در روند کلی هضم دارند و فعالیت آنها بیانگر کارایی گوارشی حیوانات از جمله ماهی است، بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی با افزایش قابلیت هضم مواد مغذی پیچیده در حیوانات مرتبط است (Singha et al., 2020; Chowdhury et al., 2021). در مطالعه حاضر سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز و پروتاز در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های مکمل شده بالاتر از گروه کنترل بود. نتایج مشابهی در هیبرید گروپر *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus polyphekadion* تغذیه شده با فرولیک اسید (Fu et al., 2022)، تیلاپیا تغذیه شده با کروکامین به‌عنوان ترکیب فولیک (Midhun et al., 2016)، روهو، *Labeo rohita* (Mohapatra et al., 2012) تغذیه شده با پروبیوتیک گزارش شد. اسیدهای آلی می‌تواند به‌عنوان تقویت‌کننده آنزیم‌های گوارشی عمل کند (Fu et al., 2022). افزودنی‌های غذایی احتمالاً می‌توانند سلامت روده را از طریق ایجاد میکروبیوم‌های مفیدتر که احتمالاً می‌تواند فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی را تعدیل کنند، بهبود ببخشند (Hashemi and Davoodi, 2011). اثر محرک رشد ناشی از پلی‌فنول‌ها به بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی و سنتز RNA، DNA و پروتئین‌ها و همچنین تنظیم ترکیب میکروارگانسیم‌ها نسبت داده می‌شود. (Safari et al., 2020). فعالیت پروتازها و لیپاز در تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بالاتر از گروه کنترل بود. برخی از باکتری‌ها قادر به ترشح پروتازها هستند که باندهای پپتیدی موجود در پروتئین‌ها را به مونومرهای قابل جذب تبدیل می‌کند که می‌تواند برای وضعیت تغذیه‌ای جاندار مؤثر باشند. در مطالعه حاضر حضور پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت پروتازها شده است. آنزیم‌های آگزوزن تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها فقط یک بخش

فرمیک‌اسید و پروبیوتیک LR می‌تواند باعث فعال شدن سلول‌های ایمنی شود و در نتیجه توانایی ارگانسیم برای دفاع در برابر عوامل مضر و عوامل استرس‌زا را افزایش دهد. تقویت بالقوه پاسخ ایمنی مرتبط با اسیدی شدن رژیم غذایی و/یا پروبیوتیک‌ها ممکن است به توانایی آنها در مهار رشد میکروارگانسیم‌های مضر در کل دستگاه گوارش نسبت داده شود. افزایش فاکتورهای ایمنی مشاهده شده در جیره‌های مکمل شده نشان می‌دهد که استفاده همزمان از این مکمل‌ها باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی در گورخر ماهی در مقایسه با تجویز مستقل هر یک از این ترکیبات می‌شود.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده مجزا و توأم اسید فرمیک و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* سبب بهبود رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ایمنی می‌گردد و بهترین نتایج در گروه تغذیه شده به‌صورت همزمان اسید فرمیک و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* به‌دست آمد. بنابراین استفاده از این ترکیبات به‌صورت توأم به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی گورخر ماهی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در مرکز ماهیان زینتی ساری واقع در قائمشهر انجام شد بنابراین از تمام افرادی که در مسیر انجام این تحقیق همکاری داشتند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

کوچکی از فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش می‌باشد. بنابراین فعالیت آنزیمی بالاتر در گروه‌های مکمل شده با پروبیوتیک اساساً نتیجه تحریک توسط پروبیوتیک یا آنزیم‌های اگزوژن تولید شده برای تحریک سنتز آنزیم‌های اندوژن می‌باشد که ممکن منجر به فرآیند هضم بهتر، رشد مناسب‌تر و کارایی غذای بهتر شود (Mohapatra et al., 2012). در مطالعه حاضر فرمیک‌اسید و پروبیوتیک LR به‌طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی نسبت به گروه کنترل شده است بنابراین بهبود رشد ممکن به‌خاطر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی باشد.

تحریک عملکردهای ایمنی و همورال مانند فعالیت فاگوسیتوز، فعالیت لیزوزیم و فعالیت مکمل‌ها، مقاومت به بیماری را در ماهی افزایش می‌دهند (Dawood et al., 2020). تقویت پاسخ‌های ایمنی ماهی در شرایط پرورشی یک رویکرد مفید برای کنترل شیوع بیماری‌ها و عفونت‌ها و در نتیجه مرگ و میر است (Mehana et al., 2015). نتایج مطالعه حاضر در فعالیت آنزیم لیزوزیم و میزان مرگ و میر ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که ماهیان تغذیه شده با فرمیک‌اسید و پروبیوتیک LR وضعیت بهتری نسبت به گروه شاهد داشتند. انواع مختلفی از پروبیوتیک‌ها (Akanmu et al., 2016; Hassan et al., 2018; Zhang et al., 2020; Mohammadian et al., 2022) و اسیدهای آلی (Zhang et al., 2020; Yousefi et al., 2023) برای تقویت پاسخ ایمنی ماهی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده مجزا و توأم

منابع

- محمدی ن.، توکمه‌چی ا. ۱۳۹۴. تأثیر استفاده توأم نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* بر شاخص‌های رشد و تجمع پروبیوتیک در روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۰(۱): ۴۷-۵۳.
- Ahmadifar E., Dawood M.A., Moghadam M.S., Sheikhzadeh N., Hoseinifar S.H., Musthafa, M.S. 2019. Modulation of immune parameters and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*) using dietary apple cider vinegar. *Aquaculture* 513, p.734412.
- Ahmadifar E., Sheikhzadeh N., Roshanaei K., Dargahi N., Faggio C. 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)?. *Aquaculture* 507, 341-348.
- Ahmed E.A., Hassan M.F.M. 2013. Pharmacological studies of feed additives (Sanguinarine and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, hematological and intestinal bacterial count with challenge test by *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio*. *Global Animal Science Journal* 1(1).
- Akanmu O.A., Emikpe B.O., Omitoyin B.O., Ajani E.K., Alao S.O. 2016. Evaluation of the wound healing potential of the diets fortified with *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and their combination in *Heterobranchus bidorsalis* juveniles. *Zoology and Ecology* 26(4), 323-330.

- Austin B. 2006.** The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal* 6(1), 931-945.
- Chowdhury D.K., Sahu N.P., Sardar P., Deo A.D., Bedekar M.K., Singha K.P., Maiti M.K. 2021.** Feeding turmeric in combination with ginger or garlic enhances the digestive enzyme activities, growth and immunity in *Labeo rohita* fingerlings. *Animal Feed Science and Technology* 277, p.114964.
- Dawood M.A., Metwally A.E.S., El-Sharawy M.E., Ghozlan A.M., Abdel-Latif H.M., Van Doan H., Ali, M.A., 2020.** The influences of ferulic acid on the growth performance, haemato-immunological responses, and immune-related genes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. *Aquaculture* 525, p.735320.
- Fu W., Amenyogbe E., Luo J., Yang E., Huang J.S., Chen Y., Chen G. 2022.** Influences of ferulic acid on intestinal digestive and antioxidant enzymes, immune, antioxidant gene and tight junction protein expression and microbiota in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus polyphekadion*♂). *Aquaculture Reports* 27, p.101348.
- Guardiola F.A., Porcino C., Cerezuela R., Cuesta A., Faggio C., Esteban M.A. 2016.** Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* 52, 298-308.
- Hashemi S.R., Davoodi H. 2011.** Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications* 35, 169-180.
- Hassan H., Rompola M., Glaser A.W., Kinsey S.E. Phillips R.S. 2018.** Systematic review and meta-analysis investigating the efficacy and safety of probiotics in people with cancer. *Supportive Care in Cancer* 26, 2503-2509.
- Hassan S., Abdel-Rahman M., Mansour E.S. Monir W., 2020.** Prevalence and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens implicating the mortality of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal for Aquaculture* 10(1), 23-43.
- Hoseinifar S.H., Fazelan Z., El-Haroun E., Yousefi M., Yazici M., Van Doan H. Paolucci M. 2023.** The effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on growth performance, antioxidant status, and immunity of zebrafish (*Danio rerio*). *Fishes* 8(6), 326.
- Lee S., Kim S., Oh Y., Lee Y. 2000.** Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trouts in Korea. *Journal of Microbiology* 38(1), 1-7.
- Mehana E.E., Rahmani A.H., Aly S.M. 2015.** Immunostimulants and fish culture: an overview. *Annual Research & Review in Biology* 5(6), 477-489.
- Mehrabi F., Khalesi M Hazaie K., 2018.** Effects of pre-and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry from the Caspian Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18(4), 597-602.
- Midhun S.J., Arun D., Edatt L., Sruthi M.V., Thushara V.V., Oommen O.V., Sameer Kumar V.B. Divya L., 2016.** Modulation of digestive enzymes, GH, IGF-1 and IGF-2 genes in the teleost, Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by dietary curcumin. *Aquaculture International* 24, 1277-1286.
- Mohammadian T., Monjezi N., Peyghan R. Mohammadian B., 2022.** Effects of dietary probiotic supplements on growth, digestive enzymes activity, intestinal histomorphology and innate immunity of common carp (*Cyprinus carpio*): a field study. *Aquaculture* 549, p.737787.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Prusty A.K., Pani Prasad K., Mohanta K.N., 2014.** Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of *Labeo rohita* fingerlings reared at higher water temperatures. *PLoS one* 9(6), p.e100929.
- Moustafa E.M., Dawood M.A., Assar D.H., Omar A.A., Elbially Z.I., Farrag F.A., Shukry M., Zayed, M.M. 2020.** Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 515, p.734589.
- Rao J.V. 2006.** Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, *monocrotophos*. *Chemosphere* 65(10), 1814-1820.
- Rashidian G., Boldaji J.T., Rainis S., Prokić, M.D., Faggio C. 2021.** Oregano (*Origanum vulgare*) extract enhances zebrafish (*Danio rerio*) growth performance, serum and mucus innate immune responses and resistance against *Aeromonas hydrophila* challenge. *Animals*, 11(2), p.299.
- Reda R.M., Mahmoud R., Selim K.M., El-Araby I.E. 2016.** Effects of dietary acidifiers on growth,

- hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 50, 255-262.
- Safari R., Hoseinifar S.H., Imanpour M.R., Mazandarani M., Sanchouli H., Paolucci M., 2020.** Effects of dietary polyphenols on mucosal and humoral immune responses, antioxidant defense and growth gene expression in beluga sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture* 528, p.735494.
- Safari R., Hoseinifar S.H., Van Doan H., Dadar M. 2017.** The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 264-269.
- Singha K.P., Shamna N., Sahu N.P., Sardar P., HariKrishna V., Thirunavukkarasar R., Kumar M., Krishna G. 2020.** Feeding graded levels of protein to genetically improved farmed Tilapia (GIFT) juveniles reared in inland saline water: Effects on growth and gene expression of IGFI, IGF-IR and IGF-BPI. *Aquaculture* 525, p.735306.
- Swaminathan T.R., Rathore G., Abidi R., Kapoor D. 2004.** Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheries* 51, 251-254.
- Torrecillas S., Aboelsaadat E., Carvalho M., Acosta F., Monzon-Atienza L., Gordillo Á., Montero D. 2024.** Dietary supplementation of a combination of formic acid and sodium formate in practical diets promotes gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gut morphology and disease resistance. *Aquaculture Reports* 35, p.101951.
- Xia Y., Lu M., Chen G., Cao J., Gao F., Wang M., Liu Z., Zhang D., Zhu H. Yi M. 2018.** Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 76, 368-379.
- Yousefi M., Ghafarifarsani H., Raissy M., Yilmaz S., Vatnikov Y.A. Kulikov E.V. 2023.** Effects of dietary malic acid supplementation on growth performance, antioxidant and immunological parameters, and intestinal gene expressions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 563, p.738864.

The effects of single and combined use of *Lactobacillus rhamnosus* and formic acid on growth, digestive enzymes, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* bacteria in zebra fish (*Danio rerio*)

Aboufazel Razaghpour, Somayhe Bahram*, Seyed Rohollah Javadian

Department of Fisheries, Islamic Azad University, Qaim Shahr Branch, Qaim Shahr, Iran.

*Corresponding author: bahram.somayeh123@gmail.com

Received: 31.Agu.2024

Accepted: 29.Oct.2024

Abstract

The present study aimed to investigate the impacts of individual and combined usage of *Lactobacillus rhamnosus* (LR) and formic acid (FA) on the growth, digestive enzymes, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* bacteria in zebra fish (*Danio rerio*). A total of 240 zebra fish with an average weight of 68.2 ± 2.4 mg was distributed into 12 tanks, with each tank containing 20 fish and fed with basic diet (T0), 1×10^8 CFU (T1), 0.3% FA (T2), and both LR and FA (T4) for a duration of eight weeks. The results indicated that the experimental diets had a significant effect on final weight, weight gain, specific growth rate, and survival rate. Fish fed with LR and FA bacteria (T1, T2, and T3) exhibited higher final weights compared to those in the control group ($P < 0.05$). A notable difference in lipase and protease enzyme activity was observed among different experimental treatments; notably, T3 demonstrated the highest activity levels compared to other treatments ($P < 0.05$). Additionally, there was a significant variance in lysozyme levels between different treatments; higher amounts were observed in treatments fed with LR and FA supplements (T1, T2 and T3), demonstrating significant differences from the control group. Following exposure to *Aeromonas hydrophila* bacteria for fourteen days post-treatment period termination revealed that zebra fish subjected to LR-FA supplemented diets had lower mortality rates compared to other groups. In conclusion as per this experiment's findings suggest that incorporating *Lactobacillus rhamnosus* along with formic acid supplements into zebra fish diet can potentially yield positive effects on its growth as well as overall health.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, Formic acid, Zebrafish, Immunity, Enzyme