اثرات مصرف جداگانه پروبیوتیک و ترکیب با پربیوتیک جیره بر ساختار بافت‌شناسی روده و پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

وحید مرشدی[1]، ناصر آق[2]*، فرزانه نوری[2]، شیرین حامدی[1]، فاطمه جعفری[2]

[1]پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.

[2]پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه. ایران.

*نویسنده مسئول n.agh@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۹

چکیده

پرورش متراکم آبزیان و تولید تجاری نیاز به بهبود شرایط بهداشتی ماهی دارد و پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها به‌عنوان گزینه مناسب جهت رسیدن به این هدف در نظر گرفته می‌شوند. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات جداگانه و ترکیبی پروبیوتیک با پربیوتیک جیره بر بافت‌شناسی روده و پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) است. برای این منظور تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۸±۳۵/۱۴ گرم از پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور تهیه شد. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار (۱۵ قطعه ماهی به ازای هر تکرار) در داخل مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. بچه ماهیان به مدت ۸ هفته با جیره های فاقد پروبیوتیک و پربیوتیک (گروه شاهد)، حاوی 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 سیری ظاهری تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های بافت روده و خون جمع آوری شدند. نتایج نشان داد که ترکیب پروبیوتیک و پربیوتیک جیره عملکرد ساختار بافتی روده ماهیان را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد ($P>0/05$). در پایان آزمایش فعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون (گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL، VLDL) اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و سایر تیمارهای آزمایش نشان نداد ($P>0/05$). به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که افزودن ترکیب پروبیوتیک با پربیوتیک در مقادیر استفاده شده اثرات معنی‌داری بر بافت‌شناسی روده و پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی صبیتی ندارد. با این حال افزودن جداگانه پروبیوتیک افزایش طول ویلی را به دنبال داشت.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، پربیوتیک، بافت‌شناسی روده، پارامترهای بیوشیمیایی خون.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که در تعادل میکروبی روده میزبان نقش دارند (Moriarty, 1997). پروبیوتیک‌ها همچنین نقش مهمی در پیشگیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماری‌زا، ارتقا عملکرد رشد، افزایش بقا در دوره لاروی، افزایش ایمنی و بهبود تحمل به تنش‌های محیطی و عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند (Merrifield *et al*., 2010; Nayak, 2010; Dimitroglou *et al*., 2011). علاوه بر پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها نیز در جیره آبزیان اهمیت بالای دارند و مواد غذایی غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک رشد یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های مفید موجود در روده می‌توانند سلامتی میزبان را بهبود ببخشند (Gibson and Roberfroid, 1995). مطالعات نشان داده که استفاده هم زمان از پروبیوتیک و پربیوتیک در جیره غذایی ماهی به‌دلیل اثرات هم افزایی آن‌ها و عدم وجود مشکلاتی مانند توانایی پایین ماندگاری، تشکیل پرگنه و جایگزینی در دستگاه گوارش میزبان توسط پروبیوتیک‌های معرفی شده به جیره، از کارایی بالاتری برخوردار است (Merrifield *et al*., 2010). در خصوص افزودن سین‌بیوتیک به جیره و تاثیرات آن بر بافت روده و پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهیان تعدادی از محققین مطالعاتی را انجام داده‌اند که برخی از آن‌ها مبین اثرات مثبت و برخی دیگر حاکی از بی‌اثر بودن پروبیوتیک و پربیوتک در ماهیان است (Dimitroglou *et al*., 2010; Hoseinifar *et al*., 2014; Akter *et al*., 2016). پرورش ماهیان دریایی

یکی از شاخه‌های بسیار مهم و در حال گسترش صنعت آبزی‌پروری است به‌طوری که کل تولیدات آبزی‌پروری در جهان در سال۲۰۱۶ در حدود ۱۷۰/۹ میلیون تن و سهم آبزیان دریایی پرورشی ۲۸/۷ میلیون تن بوده است (FAO, 2018). با توجه به افزایش تولید در واحد سطح و تغییر روش پروش از سنتی به متراکم، امروزه برای پیشگیری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در صنعت آبزی‌پروری به جای دارو درمانی از محرک‌های ایمنی و سایر افزودنی‌ها از جمله پروبیوتیک و پربیوتیک استفاده می‌شود (Merrifield *et al.*, 2010).

ماهی صبیتی یکی از گونه‌های مهم و تجارتی خلیج فارس به حساب می‌آید که به‌دلیل بازار پسند بودن در کشورهای حاشیه خلیج فارس از میزان صید بالایی برخوردار است (Huntsman *et al.*, 1999). ماهی صبیتی دارای استعداد بالای پرورشی بوده و در برنامه توسعه صنعت تکثیر و پرورش ماهیان دریایی شیلات ایران قرار گرفته است. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از پروبیوتیک و پربیوتیک در جیره ماهیان بر روی شاخص‌های رشد، تغذیه و ترکیب لاشه متمرکز بوده است و از طرفی کمبود آب شیرین و اهمیت بالای پررورش ماهیان دریایی بیش از گذشته جلوه می‌نماید؛ لذا مطالعه حاضر استفاده همزمان از پروبیوتیک و پربیوتیک در جیره و اثر آن بر ساختار بافت‌شناسی روده و پارامترهای بیوشیمیایی خون را مدنظر قرار داد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محل آزمایش: این پروژه در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام‌خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور به مدت ۸ هفته به‌اجرا در آمد. برای این منظور در یک فضای سرپوشیده مجهز به سیستم هوادهی، تخلیه آب مرکزی و شیرهای تنظیم آب و هوا و سیستم گرمایشی، تعداد ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلن با سیستم آب جاری آماده گردید. آب دریا از طریق پمپ و توسط لوله‌های طراحی شده در عمق ۲ متری خور جعفری به داخل استخرهای رسوب‌گیر منتقل شده و پس از تصفیه فیزیکی و شیمیایی با عبور از فیلتر ماوراء بنفش در مخازن هوایی ذخیره و سپس به مخازن داخل سالن منتقل گردید. آب ورودی به میزان ۱ لیتر در دقیقه برای هر مخزن تنظیم شد. در ابتدای پروژه ۲۰۰ قطعه ماهی که در ایستگاه ماهیان دریایی بندر امام تکثیر شده و در آن‌جا نگهداری شده بودند با میانگین وزنی ۰/۸±۳۵/۱۴ گرم و طول استاندارد ۰/۵±۱۳/۵۳ جداسازی و براساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با تراکم ۱۵ قطعه ماهی در هر مخزن رهاسازی شدند. تیمارها به مدت ۱۰ روز با غذای تجاری به‌منظور سازش با شرایط آزمایشگاهی نگهداری گردیدند. در این مدت تغذیه ماهیان ۲ بار در روز در ساعات ۹ و ۱۶ در حد سیری ظاهری با جیره غذایی تجاری ماهیان دریایی (شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز؛ پروتئین ۴۷/۸، چربی ۱۳/۹۲، خاکستر ۹/۲۳، رطوبت ۱۰ درصد و فیبر ۲/۵ درصد) با قطر ۲ میلی‌متر انجام پذیرفت.

اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب: اندازه‌گیری اکسیژن مخازن آزمایشی به‌صورت روزانه به وسیله دستگاه دیجیتالی اکسی متر (شرکت Crison اسپانیا مدل P45) انجام گرفت. pH و دمای آب مخازن هم به صورت روزانه با استفاده از دستگاه دیجیتالی pH متر (شرکت Crison اسپانیا مدل P45) ثبت شد (جدول ۱).

کشت پروبیوتیک و آماده‌سازی غذا: جهت افزودن پروبیوتیک به غذای ماهیان از روش Chang و Liu (۲۰۰۲) استفاده گردید. به طور خلاصه، لاکتوباسیل پلانتاروم (پروبیوتیک از مرکز کلکسیون میکروبی ایران (PTCC, 1058) هر چهار روز یکبار در ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع استریل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی کشت داده شد. سپس باکتری‌های رشد یافته با کمک سانتریفیوژ با سرعت g × ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و با استفاده از بافر PBS (۰/۱ مولار

جدول ۱- فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط پرورش (خطای استاندارد ±میانگین).

دما (درجه سانتی گراد)	اکسیژن محلول (ppm)	pH	شوری (ppt)
۲۷/۰±۱/۹	۶/۳ ± ۰/۵۵	۷/۰±۵/۱۵	۴۸ ± ۰/۵

و pH= ۷/۴) دو مرتبه شستشو داده شدند. در نهایت باکتری‌های شستشو داده شده و برای تهیه غلظت مطلوب سوسپانسیون با استفاده از سرم فیزیولوژی و براساس قیاس با لوله‌های مک فارلند تعیین شد. سپس زایلوالیگوساکارید با درجه خلوص ۹۰ درصد (ساخت شرکت Longlive Bio-Technology، چین) به ترتیب در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد (Xu *et al*., 2009) توزین شده و پس از حل کردن در سرم فیزیولوژی استریل و مشخص شدن تعداد باکتری‌ها در سوسپانسیون به کمک لوله‌های مک‌فارلند، غلظت لازم در حجم مشخصی (به صورت میانگین برای هر کیلو غذای مصرفی ۱۰۰-۲۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون) تهیه و با استفاده از افشانه به صورت اسپری به غذا اضافه شد. در این مرحله سعی شد تا مکمل‌ها به‌طور یکنواخت روی تمام قسمت‌های غذا اسپری شوند. غذا به صورت هر دو هفته یک بار تهیه و در ظرف‌های پلاستیکی دربسته در داخل یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و استفاده شد. در پایان غلظت ۳ درصد ژلاتین نیز برای پوشش‌دار کردن غذا و جلوگیری از هدر رفت مکمل‌ها بر روی غذا اسپری شد و اجازه داده شد تا غذاها در دمای اتاق خشک شوند. در طول دوره پرورش حضور باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غذا مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار از غذای ماهیان به طور تصادفی چند نمونه انتخاب و در محیط کشت MRS مایع (محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک) کشت داده شد. سپس با رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت اختصاصی از تثبیت و تعداد پروبیوتیک در غذا اطمینان حاصل شد (Ringo and Gatesoup, 1998; Andani *et al*., 2012).

تیماربندی آزمایش: جهت انجام این آزمایش ۴ تیمار مختلف با ۳ تکرار در نظر گرفته شد که شامل گروه شاهد: غذای کنسانتره فاقد پروبیوتیک و پربیوتیک، تیمار۱: غذای کنسانتره حاوی 1×10^{6} cfu/g باکتری *L. plantarum*، تیمار ۲: غذای کنسانتره حاوی 1×10^{6} cfu/g باکتری *L. plantarum* + ۰/۵ درصد زایلواولیگوساکارید و تیمار ۳: غذای کنسانتره حاوی 1×10^{6} cfu/g باکتری *L. plantarum* + یک درصد زایلواولیگوساکارید بودند.

خون‌گیری و اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون: جهت بررسی وضعیت فیزیولوژیک ماهیان پس از ۸ هفته تغذیه، ۵ ماهی به صورت تصادفی از هر تکرار گرفته و سریعاً در داخل محلول ۲ فنوکسی‌اتانول با غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب قرار گرفتند (Afkhami *et al*., 2014). پس از بیهوشی از سیاهرگ دمی آن‌ها به وسیله سرنگ دو سی‌سی خون‌گیری شد. نمونه‌های تهیه شده (یک سی‌سی خون گرفته شده) بلافاصله به درون تیوب دو میلی‌لیتر حاوی هپارین (هر تیوب آغشته به هپارین) برای پلاسما منتقل و سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در × ۱۶۰۰g سانتریفیوژ شدند و بعد از آن پلاسما با استفاده از سمپلر جداسازی و درون تیوب‌های ۲ میلی‌لیتر ریخته شد (Webb *et al*., 2007) و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفتومتر Vis / UV (شرکت Unico آمریکا مدل ۲۱۰۰) صورت گرفت. گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، کلسترول به روش کلسترول اکسیداز، تری‌گلیسیرید به روش آنزیمی لیپاز و مقادیر لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی بسیار

جدول ۲- بافت‌شناسی روده بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (خطای استاندارد ±میانگین).

	تیمار شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
عرض ویلی (میکرومتر)	۸۳/۳±۵۴/۳۴^{a}	۱۰۰/۵±۲۴/۱۷^{a}	۱۰۰/۸±۲۵/۱۸^{a}	۱۰۸/۲۸±۶۰/۵۲^{a}
طول ویلی (میکرومتر)	۵۵۱/۲۳±۳۷/۴۳^{b}	۵۸۸/۱۳±۹۶/۹۲^{a}	۴۵۲/۲۶±۷۹/۸۲^{b}	۵۰۲/۹۸±۹۲/۶۸^{b}
ضخامت لایه عضلانی (میکرومتر)	۵۱/۷±۸۳/۰۵^{a}	۱۱۸/۱۸±۷۱/۲۰^{a}	۹۸/۲۶±۶۴/۸۴^{a}	۱۰۸/۱۰±۶۸/۱۷^{a}

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه در هر ستون مشخص شده‌اند دارای اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$) با یکدیگر هستند.

پایین (VLDL) با استفاده ازکیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد (Borges *et al*., 2004).

مطالعه بافت‌شناسی روده : به‌منظور مطالعه ساختار ابتدایی روده در پایان آزمایش به صورت کاملاً تصادفی از هر یک از تیمارها و گروه شاهد تعداد ۶ قطعه ماهی انتخاب (۲ قطعه به ازاء هر تکرار) و نمونه‌های بافتی جهت مشاهده توسط میکروسکوپ نوری در محلول بوئن تثبیت و سپس برای نگهداری در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند. مراحل آبگیری با استفاده از الکل های ۹۰ و ۱۰۰ درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از گزیلین شفاف‌سازی شده و به مدت ۱۲ ساعت در داخل آون (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) در پارافین مایع قرار داده و سپس قالب‌گیری شدند (Roberts, 2012). پس از قالب‌گیری با استفاده از میکروتوم (شرکت Leitz آلمان مدل ۱۵۱۲) مقاطع نمونه بافت‌ها به ضخامت ۷ میکرون برش داده شده و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری (شرکت Nikon ژاپن مدل E-600) متصل به برنامه محاسبه‌گر میکروسکوپی مورد مطالعه و اندازه‌گیری قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. برای آنالیز واریانس از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

ساختار بافت‌شناسی روده: نتایج مربوط به بافت‌شناسی روده بچه ماهیان صبیتی در انتهای دوره پرورش در جدول ۳ گزارش شده است. همچنان که در جدول مشاهده می‌شود اندازه عرض ویلی و ضخامت لایه عضلانی اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف آزمایشی و گروه شاهد نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). با این وجود اندازه طول ویلی در تیمار ۱ (۱×۱۰^{۶} CFU پروبیوتیک) به صورت معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد و سایر تیمارهای بود ($P<۰/۰۵$).

پارامترهای بیوشیمیایی خون: نتایج مربوط به فعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان صبیتی شامل گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL، VLDL در انتهای دوره پرورش در جدول ۴ گزارش شده است. همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود افزودن پروبیوتیک و پربیوتیک به جیره اختلاف معنی‌داری را در میزان پارامترهای بیوشیمیایی خون بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

بحث

بررسی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی خون می‌تواند در تشخیص بیماری‌ها و مسمومیت‌ها نقش مهمی را ایفا کند. به‌علاوه فاکتورهای بیوشیمیایی خون به‌عنوان یکی از اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری که اطلاعات زیادی را در رابطه با وضعیت سلامت آبزیان، ارزیابی

جدول ۳- فعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (خطای استاندارد ±میانگین).

	تیمار شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۲۱/۵±۰/۸۶۶۰^{a}	۱۶۹/۰±۱۹/۶۲^{a}	۱۲۲/۰±۱۳/۸۵^{a}	۱۷۰ ±۱/۷۳^{a}
تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)	۴۱۱±۱۹/۰۵^{a}	۴۴۴±۱۵/۵۸^{a}	۴۴۴±۵۸/۳۱^{a}	۴۴۷/۵ ±۱۲۲/۱۱^{a}
کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)	۳۱۴/۵±۱۰/۶۸^{a}	۳۳۰/۵±۹/۵۲^{a}	۳۲۲/۵±۱۷/۶۰^{a}	۳۵۷/۵ ±۵۹/۷۵^{a}
لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۱۸/۵±۰/۸۶۶^{a}	۱۱۸/۵±۴/۹۰^{a}	۱۱۹±۵/۱۹^{a}	۱۶۴±۲۷/۷۱^{a}
لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) (میلی گرم/دسی لیتر)	۶۵±۶/۳۵^{a}	۷۰/۵±۱/۴۴^{a}	۶۷/۵±۰/۲۸۸^{a}	۷۶/ ۵±۲/۵۹^{a}
لیپوپروتئین با چگالی بسیار پایین (VLDL) (میلی گرم/دسی لیتر)	۸۲/ ۲۰±۳/۸۱^{a}	۸۸/۸۰±۳/۱۱^{a}	۸۸/۷۵±۱۱/۶۹^{a}	۸۹/۶۵±۲۴/۴۵^{a}

نبود حروف متفاوت در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می‌باشد ($P>0/05$).

اثرات مواد مغذی و مکمل‌های تغذیه‌ای شناخته می‌شوند. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تأثیر استفاده جدا از پروبیوتیک (*L. plantarum*) و استفاده ترکیبی با پربیوتیک زایلوالیگوساکارید بر پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهی صبیتی نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بود. مطالعه مرشدی و همکاران (۱۳۹۴) بر روی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) نشان داد که سطوح مختلف پروبیوتیک جیره (لاکتوباسیلوس پلانتاروم) بر روی برخی از پارامترهای اندازه‌گیری شده مثل گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید بی‌تاثیر بوده و تنها میزان آلبومین سرم بین تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و گروه شاهد اختلاف نشان داد که هم راستا با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. برخلاف نتایج تحقیق حاضر، محمدیان و همکاران (۱۴۰۰) گزارش کردند که اضافه کردن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پنتوسوس در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان باعث کاهش معنی‌دار گلوکز در این تیمار در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد شد و برخلاف آن، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم باعث افزایش معنی‌دار گلوکز نسبت به سایر تیمارها شد. افزایش گلوکز خون ممکن است نشان‌دهنده اختلال متابولیسم کربوهیدرات به‌واسطه افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی باشد (Martinez *et al*., 2004). مطالعات محققین نشان داده است که گلوکز خون ماهیان دارای تفاوت‌های زیادی بین گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه است (Navarro and Gutierrez, 1995). Ye و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که استفاده از پربیوتیک (فروکتو ومانان الیگوساکارید)، پروبیوتیک (*Bacillus clausii*) و استفاده همزمان آن ها منجر به کاهش معنی‌دار تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی کم در مقایسه با گروه کنترل در ماهی کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) گردید؛ با این حال سین‌بیوتیک جیره تاثیری بر روی کلسترول سرم ندارد. در مطالعه محمدیان و همکاران (۱۴۰۰) افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کاهش معنی‌دار کلسترول در تمام تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد شد. براساس مطالعات پیشین پروبیوتیک‌ها با کاهش کلسترول سرم پروفیل چربی را بهبود می‌بخشند (Kavitha *et al*., 2016). پروبیوتیک‌ها از چند طریق متابولیسم کلسترول را کنترل می‌کنند، می‌توانند مانع جذب کلسترول در روده شوند و یا اینکه پروبیوتیک‌ها کلسترول را به دیواره غشای سلولی متصل می‌کنند (Liong *et al*., 2007). مکانیسم دیگری که ممکن است نقش داشته باشد در کاهش کلسترول، تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به وسیله تخمیر پروبیوتیکی است. همچنین مطالعات نشان داده است که کاهش کلسترول خون ممکن است به علت وجود برخی از باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه باکتری های تولیدکننده اسید لاکتیک باشد که می‌توانند در جذب مستقیم کلسترول در روده از طریق عدم اتصال

نمک‌های صفراوی دخالت کنند (Ooi and Liong, 2010). براساس مطالعات محققین عوامل محیطی (فصل، شوری، درجه حرارت، تراکم)، عوامل فیزیولوژیک (گونه ماهی، سن، جنس، وضعیت تغذیه ای)، زمان نمونه‌برداری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت پارامترهای بیوشیمیایی خون تاثیرگذار باشند و تفاوت در نتایج تحقیقات صورت گرفته را سبب شود (Verdegem *et al*., 1997). علاوه بر این فرمولاسیون جیره‌های غذایی، نوع پروبیوتیک مورد استفاده، سطوح مختلف پروبیوتیک جیره و روش‌های مختلف اضافه کردن پروبیوتیک به جیره نیز می‌تواند این اختلافات را ایجاد کند.

مطالعه ریخت‌نشاختی و ساختار بافت‌شناسی امری ضروری است. ریخت‌شناسی روده و بافت‌شناسی دستگاه گوارش ماهی تحت تأثیر رفتار تغذیه، منظم بودن مصرف غذا و همچنین اندازه بدن و شکل قرار می‌گیرد (Buddington *et al*., 1997). ساختار سلول‌های روده به سرعت و به‌طور برگشت‌پذیری به تغییرات جیره غذایی پاسخ می‌دهد (Buddington *et al*., 1997). اهمیت روده قدامی در هضم و جذب مواد مغذی بسیار بیشتر از بخش خلفی است (Dabrowski and Dabrowska, 1981). بنابراین بافت‌شناسی روده قدامی ماهی صبیتی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر نتایج استفاده جدا از پروبیوتیک (*L. plantarum*)، پربیوتیک زایلوالیگوساکارید و استفاده هم زمان از آن‌ها بر ساختار بافت روده شامل اندازه عرض ویلی و هم چنین ضخامت لایه عضلانی نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بود. با این حال اندازه طول ویلی در تیمار ۱ (۱×۱۰^{۶} CFU پروبیوتیک) به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و سایر تیمارها بود. Dimitroglou و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که با افزودن پربیوتیک مانان اولیگوساکارید (MOS) به جیره غذایی ماهی سیم سر طلائی (*Sparus aurata*) افزایش معنی‌داری در ساختار ویلی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده گردید. ساختار بافت روده به‌دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک و پربیوتیک در تحقیقات مختلف بررسی شده است. Zhou و همکاران (۲۰۱۰)، Cerezuela و همکاران (۲۰۱۳a) و Akter و همکاران (۲۰۱۶) به ترتیب با افزودن سه پربیوتیک اینولین، گالاکتواولیگوساکارید (GOS) و MOS، اضافه کردن پروبیوتیک (*Bacillus subtilis*) و سطوح ترکیبی پروبیوتیک (*B. subtilis*) و اینولین و مکمل‌سازی مانان اولیگوساکارید به جیره ماهی شوریده (*Sciaenops ocellatus*)، سیم سر طلائی و گربه‌ماهی راه راه (*Pangasianodon hypophthalmus*) افزایش ساختار بافت روده (اندازه طول ویلی) را مشاهده کردند که هم‌راستا با یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد. مطالعات نشان داده است که لوله گوارش یکی از معمول‌ترین محل ها برای باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد، بزرگ شدن پرزهای روده می‌تواند به افزایش سطح جذب و بهبود هضم و جذب مواد مغذی منجر شود (Firouzbakhsh *et al*., 2011). پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها در روده با ایجاد رقابت برای فضا و غذا و تولید اسیدهای آلی، اسیدی کردن محیط روده و تولید مواد ضدباکتریایی فضا را برای کاهش باکترهای بیماری‌زا و افزایش سلامت و وضع عمومی ماهی بهتر می‌کند (Ferguson *et al*., 2010).

مغایر با یافته‌های مطالعه حاضر اضافه کردن پربیوتیک زایلوالیگوساکارید به جیره غذایی اسکار (*Astronotus ocellatus*) با سطوح انتخابی ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد و ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) با سطوح انتخابی ۰، ۱، ۲ و ۳ درصد تغییری در ساختار بافت روده (طول و عرض ویلی و هم چنین ضخامت لایه عضلانی) را در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرد (Hoseinifar *et al*., 2014, 2016). همچنین Heidarieh و همکاران (۲۰۱۳) با افزودن مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) به میزان ۵ درصد و مقایسه با جیره شاهد ماهی قزل‌آلا اختلاف معنی داری در ساختار بافت روده (اندازه طول و عرض ویلی)

در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند که با یافته‌های تحقیق حاضر در مورد عرض ویلی و ضخامت لایه عضلانی هم خوانی دارد.

تناقض در نتایج در مطالعات مختلف ممکن است به علت اختلاف نوع و میزان محرک‌های ایمنی، درجه خلوص افزودنی ها، نوع جیره غذایی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، گونه ماهی و سن آن باشد (Merrifield *et al*., 2010). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عدم وجود اختلاف معنی‌دار را در تیمارهای ترکیب پروبیوتیک با پربیوتیک زایلوالیگوساکارید (تیمارهای ۲ و ۳) می‌توان به کم بودن سطوح انتخابی پربیوتیک جیره و عدم ایجاد هم‌افزایی با پروبیوتیک و به دنبال آن عدم بهبود در ساختار بافت روده نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که استفاده جداگانه از پروبیوتیک (*L. plantarum*) و هم‌زمان با پربیوتیک زایلوالیگوساکارید در بچه ماهی صبیتی با وزن استفاده شده در هیچ کدام از تیمارها پارامترهای بیوشیمیایی خون را تحت تاثیر قرار نداد؛ با این حال افزودن جداگانه پروبیوتیک مذکور افزایش طول ویلی در روده را به همراه داشت. لذا این پروبیوتیک می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی ماهی صبیتی باشد. اما ترکیب آن با پربیوتیک در غلظت‌های استفاده شده برای ماهی صبیتی توصیه نمی‌شود.

منابع

محمدیان ت.، جانگردان نژاد ع.ح.، بدیعی ا.، مومنی ح.، تابنده م.ر.، موسوی خراسانی س.پ. ۱۴۰۰. اثر پروبیوتیک‌های درونزاد جدا شده از ماهی بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۶(۱): ۳۰-۲۲.

مرشدی و.، نفیسی بهابادی م.، عضدی م.، مدرسی م.، چراغی س. ۱۳۹۴. اثرات پروبیوتیک جیره (*Lactobacillus plantarum*) بر ترکیب لاشه، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون و آنزیم‌های کبدی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcalifer*, Bloch 1790). مجله علوم و فنون دریایی. ۱۴(۲): ۱۴-۱.

Afkhami M., Ahmadi M.R., Salarzadeh A., Ehsanpour M. 2014. Comparative efficacy of two anesthetic agents in the Sobaity sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes 1830). *Comparative Clinical Pathology* 23(4), 841-846.

Akter M.N., Sutriana A., Talpur A.D., Hashim R. 2016. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Iinternational* 24(1), 127-144.

Andani H.R.R., Tukmechi A., Meshkini S., Sheikhzadeh N. 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology* 28(5), 728-734.

Borges A., Scotti L.V., Siqueira D.R., Jurinitz D.F., Wassermann G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia´ (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry* 30(1), 21-25.

Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-McKellep A.M. 1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum* 638, 67-80.

Cerezuela R., Fumanal M., Tapia-Paniagua S.T., Meseguer J., Moriñigo M.Á., Esteban M.Á. 2013a. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish and Shellfish Iimmunology* 34(5), 1063-1070.

Chang C.I.W., Liu W.Y. 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 25, 311-315.

Dabrowski K., Dabrowska. H. 1981. Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 69(1), 99-111.

Dimitroglou A., Merrifield D.L., Spring P.,

Effects of a synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high-and low-fat diets. *British Journal of Nutrition* 98(4), 736-744.

Martinez C., Nagae M., Zaia C., Zaia D. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the Neotropical fish Prochilodus lineatus. *Brazilian Journal of Biology* 64(4), 797-807.

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.

Moriarty D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151, 333-349.

Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka P.W., Mommsen T. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp: 393-434.

Nayak S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 2-14.

Ooi L.G. Liong M.T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 2499-2522.

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

Roberts R.J. 2012. Fish pathology. John Wiley and Sons. 592p.

Verdegem M.C.J., Hilbrands A.D., Boon J.H. 1997. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus & Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture Research* 28, 453-459.

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 Sweetman J., Moate R., Davies S.J. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182-188.

Ferguson R.M.W., Merrifield D.L., Harper G.M., Rawling M.D., Mustafa S., Picchietti S. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of ongrowing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* 109, 851-862.

Firouzbakhsh F., Noori F., Khalesi M.K., Jani-Khalili K. 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Journal of Fish Physiology and Biochemistry* 37, 833-842.

Gibson G.R., Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.

Heidarieh M., Mirvaghefi A.R., Akbari M., Sheikhzadeh N., Kamyabi-Moghaddam Z., Askari H., Shahbazfar A.A. 2013. Evaluations of Hilyses™, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, enzymatic activities and gastrointestinal structure. *Aquaculture Nutrition* 19(3), 343-348.

Hoseinifar S.H., Sharifian M., Vesaghi M.J., Khalili M., Esteban M.Á. 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish and Shellfish Immunology* 39(2), 231-236.

Hoseinifar S.H., Khalili M., Sun Y.Z. 2016. Intestinal histomorphology, autochthonous microbiota and growth performance of the Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831) following dietary administration of xylooligosaccharide. *Journal of Applied Ichthyology* 32(6), 1137-1141.

Huntsman G.R., Potts J., Maye K., Vaughan D. 1999. Grouper and seabream Endangered open predator of reef community. *American Fisheries Society Symposium* 23, 227-231.

Kavitha K., Reddy A.G., Reddy K.K., Kumar C.S., Boobalan G., Jayakanth K. 2016. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of pioglitazone, insulin and synbiotic in diabetic rats. *Veterinary World* 9(2), 118-121.

Liong M.T., Dunshea F.R., Shah N.P. 2007.

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*. *Aquaculture Nnutrition* 17(4), 902-911.

Zhou Q.C., Buentello J.A., Gatlin D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309(1-4), 253-257.

Effects of using single probiotic and combination with dietary prebiotic on intestine histological structure and blood biochemical parameters of Sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling

Vahid Morshedi[1], Naser Agh[*2], Farzane Noori[1], Shirin Hamedi[1], Fatemeh Jafary[2]

[1]Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.
[2]Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
*Corresponding author: n.agh@urmia.ac.ir

Received: 2021/8/2 Accepted: 2021/12/20

Abstract

Intensive aquaculture and commercialization production are believed to be needed for improving fish health status and probiotics and prebiotics are candidates to achieve this goal. The aim of this study was to evaluate the single and combined effects of dietary probiotic with prebiotic on intestine histology and blood biochemical parameters of Sobaity fingerling (*Sparidentex hasta*). For this purpose, a total of 180 Sobaity fingerlings were prepared with an average weight of 35.14±0.8g 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 (15 fish per each replication) in fiberglass tanks with 300 liters volume. Fish were fed with feed containing without supplementation (control group), probiotic 10^6 CFU/g feed (treatment 1), 0.5 and 1 percent prebiotic 10^6 CFU/g feed (treatment 2 and 3) at satiation for a period of 8 weeks. At the end of the experiment, the intestine and blood samples were collected. The results showed that combination of dietary probiotic with prebiotic did not change intestine histology of Sobaity fish (P>0.05). At the end of the experiment, the dietary prebiotic and probiotic also did not change blood biochemical parameters (glucose, triglycerides, cholesterol, HDL, LDL and VLDL) (P>0.05). This study showed that combination of probiotic with prebiotic at the used amounts had no significant effects on intestine histology and blood biochemical parameters of Sobaity fish. However, single supplementation of probiotic causes the elevation of villi length.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Intestine histology, Blood biochemical parameters.