



مطالعه تأثیر سینبیوسیس فروکتوالیگوساکارید با پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس (*Pediococcus acidilactici*) و لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis*) بر برخی شاخص‌های رشد، هماتولوژی و فلور باکتریایی دستگاه گوارش بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum Kamenskii 1901*) دریای خزر

مهدی سلطانی^{۱*}، سید سعید میرزرگر^۱، غلامرضا بادزهره^۱، مهرداد فرهنگی^۲، علیرضا ولی پور^۳

۱- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۲- دانشیار، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۳- دانشجوی دکتری، بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

۴- دانشیار، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۵- استادیار، پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی

پذیرش: ۹۵/۰۱/۲۱

دریافت: ۹۴/۱۰/۱۳

*نویسنده مسئول: msoltani@ut.ac.ir

چکیده:

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر سینبیوسیس پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید و باکتری‌های پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس بر شاخص‌های رشد، فاکتورهای خونی و میکروبیوتای روده بچه ماهی سفید دریای خزر است. براساس کشت باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی و تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر سه تیمار با غلظت یکسان ۰/۵ درصد فروکتوالیگوساکارید به‌اضافه لاکتوکوکوس لاکتیس و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس به‌ترتیب با غلظت ۱۰^۷ و ۱۰^{۱۰} (تیمار اول)، ۱۰^{۱۰} و ۱۰^۷ (تیمار دوم) و ۱۰^۷ و ۱۰^{۱۰} (تیمار سوم) کلنی برگرم غذا انتخاب شد. ماهیان سفید با میانگین وزن (۰/۷۵ ± ۰/۰۲) گرم انتخاب و پس از دو هفته سازگاری با تراکم ۴۰۰ قطعه در تانک‌های فایبرگلاس با حجم آبیگری ۱۰۰۰ لیتر رهاسازی و ۶۰ روز پرورش یافتند. نتایج بررسی نشان داد شاخص وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه در تیمارهای مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معناداری بهتر می‌باشد (p < ۰/۰۵). در ضمن در تیمار ۱ وزن نهایی برابر ۱/۶۷ گرم، ضریب تبدیل غذایی به میزان ۲ و ضریب رشد ویژه با مقدار ۱/۳۴ به‌صورت معناداری بهتر از سایر تیمارها بود. از نظر شاخص‌های خونی بین تیمارها اختلاف معناداری مشاهده نشد، اما میزان ایمونوگلوبولین در تیمار ۱ با مقدار ۲۲/۳۳ mg/ml به‌صورت معناداری بیشتر از سایر تیمارها است (p < ۰/۰۵). تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک نیز در تیمار ۱ با ۵/۲ و تیمار ۳ با ۵ لگاریتم کلنی بر گرم به‌صورت معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود. نتایج این تحقیق نشان داد پروبیوتیک و پروبیوتیک بررسی شده در این مطالعه می‌تواند اثر سینبیوسیس مطلوبی روی بچه ماهی سفید دریای خزر داشته باشد.

کلید واژگان: بچه ماهی سفید دریای خزر، سینبیوسیس، رشد، میکروبیوتای روده

مقدمه

با توجه به اثرهای نامطلوب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آبزیان و ممنوعیت مصرف این ترکیبات از سوی اتحادیه اروپا (Denev., 2009)، در سال‌های اخیر یکی از راهکارهای جدید، بهبود فلور دستگاه گوارش آبزیان و تلاش به منظور افزایش تولید و جلوگیری از میزان تلفات با استفاده از پروبیوتیک‌ها (Probiotics) و پری‌بیوتیک‌ها (Prebiotics) است. بررسی‌های محققان در سال‌های اخیر نشان داده است که استفاده از پرو و پری‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آبزیان تأثیرهای مثبتی بر فلور باکتریایی دستگاه گوارش آبزیان بر جای گذاشته و باعث بهبود شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه، ایمنی و بازماندگی در آبزیان مختلف شده است. در سال‌های اخیر بر استفاده تلفیقی از این افزودنی‌های غذایی نیز که در اصطلاح سین بیوسیس (Symbiosis) گفته می‌شود، تأکید شده و کاربرد آن نتایج خوبی نیز داشته است، زیرا مصرف توأم پروبیوتیک و پری‌بیوتیک می‌تواند تأثیر بیشتری بر شاخص‌های مذکور داشته باشد که این امر ناشی از فراهم شدن غذای پروبیوتیک توسط پری‌بیوتیک می‌باشد. به عبارت دیگر، پروبیوتیک‌ها با مصرف پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان غذای خود از رشد و ماندگاری بیشتری برخوردار بوده و در نتیجه موجب بهبود رشد و ایمنوفیزیولوژی ماهی می‌شوند. به‌علاوه آن دسته از پری‌بیوتیک‌هایی که واجد ترکیبات گلوکانی هستند، خود موجب تحریک برخی پاسخ‌های ایمنی جانور شده و از این نظر نیز مفید می‌باشند. برای مثال در مطالعه‌ای بر روی تأثیر آرتمیای غنی شده با یک ترکیب سینبیوسیس محتوای باکتری باسیلوس و مانان الیگوساکارید در لارو لابستر (*Homarus gammarus*) نشان داده شد که ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و وزن نهایی موجود متأثر از سینبیوسیس مصرفی به‌طور

معناداری بیشتر شده و علت افزایش وزن به دلیل افزایش طول و تراکم میکروویلی‌های روده در این آبی بوده است (Daniel et al., 2010). در مطالعه دیگری بر روی تأثیر ترکیب سینبیوسیس تجاری Biomim imbo در ماهی سفید دریای خزر، شاخص‌های رشد افزایش و هزینه تمام شده جیره نیز با مصرف آن به‌طور معناداری کاهش یافته است (Haghighi et al., 2010). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) نشان داده شد که اثر سینبیوتیکی فروکتوالیگوساکارید، مانان الیگوساکارید و باسیلوس سابتیلیس در افزایش شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیمی بهتر از مصرف جداگانه آنها بوده است (Ye et al., 2011). در تحقیق دیگر نیز اثر سینبیوتیکی کیتوزان الیگوساکارید و باسیلوس کوآگولنس *Bacillus coagulans* در ماهی کپور کوی (Koi) نه تنها شاخص‌های رشد را بهبود بخشید، بلکه شاخص‌های ایمنی نیز در این ماهی ارتقا پیدا کرد (Lin et al., 2012). در ماهی قزل‌آلا نیز مصرف سینبیوتیک تجاری Biomim imbo موجب ارتقای فاکتورهای رشد و ایمنی و بقای ماهی شده است (Firouzbaksh et al., 2014). همچنین استفاده از اثر سینبیوتیکی گالاکتوالیگوساکارید و باکتری پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی نیز توانست شاخص‌های ایمنی و میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلا را در مواجهه با بیماری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به شاهد به‌طور معناداری افزایش دهد (Hoseinifar et al., 2015). اسیدهای چرب کوتاه زنجیر یکی از محصولات تخمیر و تجزیه پری‌بیوتیک‌ها است که نوع و مقدار تولید آنها بسته به نوع و ترکیب پری‌بیوتیک مصرفی متغیر است. این نوع از اسیدهای چرب تولیدی در دستگاه گوارش آبزیان هم به‌عنوان منبع انرژی قابل استفاده بوده و هم تنوع و ترکیب فلور باکتریایی در دستگاه گوارش را تغییر

داده و به استقرار بهتر باکتری‌های مفید کمک می‌کند (Burr 2007). ماهی سفید دریای خزر گونه‌ای با ارزش بوده و بیشترین سهم از صید ماهیان استخوانی دریای خزر و بازسازی ذخایر کشور متعلق به آن است. این ماهی از گونه‌های با ارزش شیلاتی بوده و بدیهی است کمک به افزایش ماندگاری و تولید بچه ماهیان مقاوم بر افزایش کارایی فعالیت‌های بازسازی ذخایر آن در کارگاه‌های تکثیر از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از پژوهش حاضر مطالعه تأثیر تجویز پریبیوتیک فروکتوالیگوساکارید به‌عنوان یک سوسترای رشد بر عملکرد رشد و متابولیت‌های تولیدی دو پریبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی در شرایط آزمایشگاهی و نیز تأثیر استفاده توأم آنها با اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر آنها و در مرحله بعد مطالعه تأثیر آنها بر شاخص‌های رشد و ایمنی بچه ماهی سفید بوده است.

مواد و روش‌ها

ماهی و غذادهی

تحقیق حاضر در کارگاه تکثیر و بازسازی ذخایر شهید انصاری شیلات ایران واقع در شهرستان رشت انجام شد. بچه ماهیان سفید از این کارگاه تأمین و پس از سازگاری به‌مدت دو هفته در تانک‌های فایبر گلاس ۲۰۰۰ لیتری با تراکم ۴۰۰ قطعه در هر تانک ۲۰۰۰ لیتری با حجم آگیری ۱۰۰۰ لیتر رهاسازی شد. این طرح به‌صورت کاملاً تصادفی با یک گروه شاهد و سه گروه تیماری با سه تکرار برای هر تیمار به‌مدت ۶۰ روز انجام شد. تیمار ۱ (F₁L₂P₁)، تیمار ۲ (F₁L₂P₂) و تیمار ۳ (F₁L₁P₂)، به‌ترتیب تیمارهای انتخابی بودند که F₁ معادل ۰/۵ درصد پریبیوتیک فروکتوالیگوساکارید و

L₁ و L₂ به‌ترتیب معادل ۱۰^۷ و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم از پریبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس بوده و P₁ و P₂ نیز به‌ترتیب معادل ۱۰^۷ و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم از پریبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی است.

وزن اولیه بچه ماهی سفید به‌طور میانگین (انحراف معیار ±) وزنی (۰/۰۲ ± ۰/۷۵) گرم بود. ماهیان بر مبنای اشتها روزانه به میزان ۱۵ تا ۲۰ درصد وزنی در سه وعده غذادهی شدند (Shahkar et al., 2011). میانگین دما، pH و اکسیژن در طول دوره به‌ترتیب ۲۸ ± ۰/۲ سانتی‌گراد، ۷/۴ ± ۰/۱۵ و ۶ ± ۰/۳۶ میلی‌گرم در لیتر بود. غذای تجارتي پودری به‌نام SFK از شرکت خوراک آبزبان مازندران برای تغذیه ماهیان تهیه شد. ترکیبات شیمیایی غذای مورد نظر شامل رطوبت (۹/۳۱ ± ۴/۵ درصد)، پروتئین (۱/۵ ± ۳۵ درصد)، چربی (۸/۷ ± ۱/۱ درصد) و فیبر (۰/۸ ± ۵ درصد) بود. زیست‌سنجی از ماهیان هر دو هفته یکبار انجام شد. برای این کار تعداد ۱۰ درصد از ماهیان را صید و سپس با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ درصد وزن شدند. شاخص‌های رشد مانند افزایش وزن نهایی، افزایش طول نهایی، درصد بازماندگی، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی نیز تعیین شد. غذای مورد استفاده نیز روزانه آماده و به ماهیان داده شد. برای آماده‌سازی غذا برای تغذیه ماهیان ابتدا در شرایط استریل پریبیوتیک و پریبیوتیک مورد نظر بر مبنای تیمار انتخابی به غذا اضافه شد. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد) مخلوط و غذای خمیری تهیه و در فضای آزمایشگاه خشک گردید. به‌منظور تثبیت بهتر پریبیوتیک‌ها به میزان یک درصد روغن آفتابگردان به جیره‌ها اضافه و درون ظرف‌های غذادهی موجود در هر تانک قرار داده شد (Bandyopadhyay et al., 2009).

پروبیوتیک و پروبیوتیک استفاده شده

از پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید با نام تجاری Fructooligosaccharid from chicory (Sigma) و پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی با نام تجاری باکتوسل (Lallemand, France) و لاکتوکوکوس لاکتیس به دست آمده از دستگاه گوارش ماهیان خاویاری ایران که پیش از این با توالی‌یابی ژنی تأیید شده بود، استفاده شد.

تعیین شاخص‌های خونی

در پایان دوره برای تعیین شاخص‌های خونی از ماهیان خونگیری شد. برای این کار ابتدا ماهیان با پودر گل میخک بیهوش (غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و از ۴۰ قطعه از آنها در هر تیمار با خشک کردن بدن و قطع ساقه دمی خونگیری و نمونه‌های خون آنها با هم مخلوط شد. نمونه‌های خون در لوله‌های اپندروف حاوی هیپارین جمع‌آوری و پس از آن در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله برای جداسازی سرم اقدام شد. برای جداسازی سرم نیز از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. اندازه‌گیری تعداد گلبول قرمز با محلول Levis و لام نئوبارو تعداد گلبول سفید نیز با محلول Levis در ۰/۱ گرم (Brilliant crystal blue) و با لام نئوبار انجام شد. برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید نیز پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی با گیمسا و شمارش سلولی در زیر میکروسکوپ اقدام شد. اندازه‌گیری هموگلوبین با استفاده از محلول درایکین و در طول موج ۵۴۰ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. درصد هماتوکریت نیز با سانتریفوژ Nuve و با دور ۱۴۰۰۰ به دست آمد. میزان ایمونوگلوبولین تام سرم براساس روش (Siwicki et

al.,1993 و فعالیت لیوزیم با استفاده از روش (Ellis 1,990) سنجش شد. اندازه‌گیری آنالیز تقریبی ترکیبات شیمیایی غذا و لاشه ماهی نیز با روش (AOAC.,1990) انجام گردید.

کشت میکروبی

برای شمارش باکتری‌های روده در پایان آزمایش پس از ۲۴ ساعت قطع غذای ماهیان، روده تعداد ۱۰ ماهی در هر تیمار در شرایط استریل جدا و هموژن گردید. سپس با استفاده از محلول نمکی ۰/۹ درصد رقت‌های سریالی ۱۰^۱ تا ۱۰^{-۱۰} تهیه و در شرایط استریل میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط DeMan, Rogosa and Sharpe یا MRS (محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک) تلقیح و به مدت ۵ شبانه روز در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس تعداد کلنی‌های تشکیل یافته شمارش گردید. برای تعیین شمارش کلی باکتریایی نیز ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره روده هموژن شده را روی محیط‌های MRS و ژلوز خون تلقیح و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۵ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌ها شمارش گردید.

اندازه‌گیری اسیدهای چرب

اندازه‌گیری اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (اسید پروپیونیک، اسید بوتریک و اسید استیک) با استفاده از دستگاه GC مدل Agilent 9750 ساخت امریکا در پژوهشگاه دانشگاه تهران انجام گردید. برای استخراج سوپر ناتانت در انتهای مرحله لگاریتمی رشد، ۲ میلی‌لیتر از محیط برداشته و در سانتریفوژ با دور ۱۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. سپس عصاره باکتریایی با فیلترهای ۰/۲ میکرونی هر تیمار فیلتر شده و سوپر ناتانت به دست آمده به میکروتیوب‌ها منتقل و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا اندازه‌گیری

اسیدهای چرب نگهداری گردید. برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب ۲۰ میکرولیتر از سوپرناتانت را به دستگاه GC تزریق و با منحنی استاندارد هر اسید چرب مقایسه و مقادیر هر کدام قرائت گردید.

تجزیه تحلیل داده‌ها

در ارزیابی آماری و تعیین اختلاف معنادار در سطح $(p < 0/05)$ از طرح فاکتوریل و آنالیز واریانس دوطرفه برای ارزیابی اثر سینبوسیس کشت آزمایشگاهی باکتری‌ها و در مرحله پرورش ماهیان نیز از طرح کاملاً تصادفی و سپس آنالیز واریانس یکطرفه (Anova) با آزمون چند دامنه توکی به کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

تأثیر سینبوسیس در شرایط آزمایشگاهی

در این مطالعه به منظور انتخاب ترکیب مناسب برای تلفیق پروبیوتیک و پریبیوتیک کشت تلفیق این دو ترکیب نیز در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس دوطرفه و معنادار بودن $(p < 0/05)$ میزان تولید اسید استیک متأثر از اثر متقابل سه عامل غلظت، نوع پروبیوتیک و درصد فروکتوالیگوساکارید در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نقش اسید استیک در ایجاد رشد مناسب در پروبیوتیک مصرفی از بین تیمارهای مطالعه شده سه تلفیق شامل تیمار ۱ ($F_1L_2P_1$)، تیمار ۲ ($F_1L_2P_2$) و تیمار ۳ ($F_1L_1P_2$) انتخاب گردید.

جدول ۱ تجزیه واریانس دوطرفه تأثیر تلفیقی تیمارها بر تولید اسید استیک

غلظت پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی (C)		غلظت لاکتوکوکوس لاکتیس (B)		درصد فروکتوالیگوساکارید (A)			اسید استیک
10^{10} CFU/ml	10^7 CFU/ml	10^{10} CFU/ml	10^7 CFU/ml	۲	۱	۰/۵	
p-value							
ABC	BC	AC	AB	C	B	A	
0.049	0.149	0.315	0.189	0.03	0.937	0.000	

تبدیل غذایی در تیمار شاهد بیشتر از سایر تیمارها بوده است. به علاوه ضریب رشد ویژه در تیمارهای استفاده شده بهتر از شاهد بود و در این بین تیمار ۱ بیشتر از بقیه بود. همچنین درصد افزایش وزن روزانه در تیمار ۱ بیشتر از بقیه تیمارها بود.

نتایج شاخص‌های رشد

نتایج حاصل از تأثیر این تیمارها بر روی شاخص‌های رشد بچه ماهی سفید دریای خزر در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین افزایش وزن متعلق به تیمار ۱ بوده است. تیمار شاهد کمترین افزایش وزن را داشته و در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معناداری را نشان داد $(p < 0/05)$. ضریب

جدول ۲ مقایسه شاخص‌های رشد بچه ماهی سفید دریای خزر در تیمارهای استفاده شده

شاخص‌ها	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (گرم)	$0/75 \pm 0/02$	$0/75 \pm 0/02$	$0/75 \pm 0/02$	$0/75 \pm 0/02$
وزن نهایی (گرم)	$1/4 \pm 0/03$	$1/68 \pm 0/05$	$1/59 \pm 0/0$	$1/54 \pm 0/01$
طول کل اولیه (سانتی‌متر)	$4 \pm 0/05$	$4 \pm 0/05$	$4 \pm 0/05$	$4 \pm 0/05$

شاخص‌ها	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
طول کل نهایی (سانتی متر)	۵/۳ ^a ± ۰/۰۵	۵/۸۳ ^c ± ۰/۱۴	۵/۵ ^{bc} ± ۰/۰۵	۵/۵ ^b ± ۰/۰۸
ضریب تبدیل غذایی	۳/۳ ^b ± ۰/۲۴	۲ ^a ± ۰/۰۵	۲/۱ ^a ± ۰/۱۸	۲/۲ ^a ± ۰/۱۵
ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۰۴ ^a ± ۰/۰۱	۱/۳۴ ^c ± ۰/۰۵	۱/۲۵ ^b ± ۰/۰۰	۱/۲۵ ^b ± ۰/۰۱
درصد بازماندگی	۹۹ ^b ± ۰/۰	۹۹ ^b ± ۰/۰	۱۰۰ ^a ± ۰/۰	۹۸ ^b ± ۰/۳۳

داده‌ها شامل میانگین ± انحراف معیار است. ارقام نشانه گذاری شده با حروف مختلف لاتین اختلاف معنادار در سطح (آزمون توکی $p < 0.05$) دارند.

تیمار ۱ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^۷ کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۲ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۳ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید اضافه ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی

SGR (ضریب رشد ویژه) = {لگاریتم طبیعی وزن نهایی به گرم - لگاریتم طبیعی وزن اولیه به گرم} / زمان × ۱۰۰

FCR (ضریب تبدیل غذایی) = مقدار غذای خورده شده به گرم / افزایش وزن به گرم

درصد بازماندگی = (تعداد بچه ماهی پایان دوره / تعداد بچه ماهی ابتدای دوره) × ۱۰۰

نتایج آنالیز لاشه

نتایج آنالیز لاشه ماهیان در جدول ۳ آمده است به طوری که

شاخص‌های مطالعه شده عمدتاً از اختلاف معناداری

برخوردار نبودند ($p < 0.05$).

جدول ۳ مقایسه آنالیز لاشه (میانگین ± انحراف معیار) بچه ماهی سفید دریای خزر در تیمارهای استفاده شده

شاخص (درصد)	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
رطوبت	۶۸/۶ ^a ± ۱/۶	۶۸/۸ ^a ± ۱	۶۸/۲ ^a ± ۱/۵	۶۸/۱ ^a ± ۱/۸
پروتئین	۱۶/۲ ^a ± ۰/۶	۱۶/۸۵ ^a ± ۰/۵	۱۶/۴۴ ^a ± ۰/۷	۱۷/۱ ^b ± ۰/۵۵
چربی	۱۰/۸ ^a ± ۱/۶	۱۱/۱ ^a ± ۰/۵۵	۱۱/۲ ^a ± ۰/۹	۱۰/۸ ^a ± ۰/۴۵
خاکستر	۳/۹ ^a ± ۰/۵۶	۳/۹ ^a ± ۰/۲	۳/۸ ^a ± ۰/۳۲	۴ ^a ± ۰/۶۶

تیمار ۱ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^۷ کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۲ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۳ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید اضافه ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی

نتایج هماتولوژی

تیمار شاهد دارای اختلاف معناداری نبوده است

($p > 0.05$). میزان هموگلوبولین در تیمار ۱ بیشتر از شاهد

بوده اما در تیمار ۲ و ۳ کمتر از شاهد بوده است

($p > 0.05$). بیشترین میزان نوتروفیل در تیمار ۲ و ۳ و

کمترین میزان در تیمار ۱ به دست آمد ($p > 0.05$). درصد

لنفوسیت‌ها در تیمار ۱ بیشتر از سایر تیمارها بوده است

($p > 0.05$).

تأثیر تیمارها بر روی شاخص‌های خونی در جدول ۴ ارائه

شده است. در این مطالعه تیمارهای استفاده شده بر روی

شاخص‌های خونی در سطح ($p > 0.05$) تأثیر معناداری

نداشته است. تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۲ بیشتر از

شاهد اما در سایر تیمارها کمتر از شاهد بوده است. میزان

گلبول قرمز نیز با وجود افزایش آن در تیمار ۱ نسبت به

نتایج بیوشیمیایی خون

شد و میزان ایمونوگلوبولین سرم در تیمار ۱ به صورت معناداری بیشتر از سایر تیمارها بود، در حالی که بین تیمارهای شاهد و ۲ اختلاف معناداری دیده نشد ($p > 0/05$). کمترین میزان ایمونوگلوبولین مربوط به تیمار ۳ بوده است. از نظر میزان لیزوزیم نیز با وجود بالا بودن میزان آن در تیمارها نسبت به شاهد اختلاف معناداری بین آنها وجود نداشت ($p > 0/05$).

نتایج بیوشیمیایی خون در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان گلوکز در تیمار ۱ بیشتر از سایر تیمارها بوده است، اما از اختلاف معناداری برخوردار نبود ($p > 0/05$). میزان گلوکز در تیمارهای ۲ و ۳ نیز بیشتر از تیمار شاهد بوده است. مقدار پروتئین سرم نیز در تیمارهای ۱ و شاهد به طور معناداری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ بوده است ($p < 0/05$). بیشترین میزان پروتئین در تیمار ۱ مشاهده

جدول ۴ مقایسه شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی بچه ماهی سفید دریای خزر در تیمارهای استفاده شده

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
جمعیت لکوسیتی (هزار در میلی متر مکعب)	۳/۸ ^a ±۲۵۱	۳/۲ ^a ±۵۷	۳/۸ ^a ±۳۱۷	۳/۵ ^a ±۲۰۸
گلبول قرمز (میلیون در میلی متر مکعب)	۱/۵ ^a ±۱۳۶	۱/۶ ^a ±۱۹۶	۱/۵ ^a ±۳۴	۱/۴ ^a ±۵۳
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۷/۲ ^a ±۰/۵۵	۷/۵ ^a ±۰/۷۳	۷/۰۳ ^a ±۰/۱۴	۶/۵ ^a ±۰/۱۵
هماتوکریت (درصد)	۳۸/۳۳ ^a ±۳/۳	۳۹/۳۳ ^a ±۳/۸	۳۷ ^a ±۰/۵۷	۳۴/۶۶ ^a ±۰/۸۸
نوتروفیل (درصد)	۲۳/۳۳ ^a ±۱/۸۵	۲۰/۶ ^a ±۰/۸۸	۲۶ ^a ±۱/۵۲	۲۴/۳ ^a ±۱/۸۵
لنفوسیت (درصد)	۷۱/۳ ^a ±۱/۰۸۵	۷۵/۶ ^a ±۰/۸۸	۶۹/۶ ^a ±۲/۳	۷۱/۳ ^a ±۱/۴۵
مونوسیت (درصد)	۴/۶ ^a ±۰/۳۳	۳/۳ ^a ±۰/۳۳	۴ ^a ±۱	۴ ^a ±۰/۵۷
انوزینوفیل (درصد)	۰/۳۳ ^a ±۰/۳۳	۰/۳۳ ^a ±۰/۳۳	۰/۳۳ ^a ±۰/۳۳	۰/۳۳ ^a ±۰/۳۳
گلوکز (mg/dl)	۳۸/۳۳ ^a ±۱/۰۴۵	۴۷/۶۶ ^a ±۲/۶	۴۵/۶۶ ^a ±۱/۴۵	۴۵/۶۶ ^a ±۰/۸۸
پروتئین (g/dl)	۴/۲ ^b ±۰/۳۳	۴/۴ ^b ±۰/۱۶	۳/۶۶ ^{ab} ±۰/۰۶	۳/۲۶ ^a ±۰/۳۳
ایمونوگلوبولین (mg/ml)	۱۸/۶۶ ^b ±۰/۳۳	۲۲/۳۳ ^c ±۰/۶۶	۱۸/۶۶ ^b ±۰/۳۳	۱۶/۳۳ ^a ±۰/۳۳
لیزوزیم (µg/ml)	۱۹/۳۳ ^a ±۰/۸۸	۲۰/۳۳ ^a ±۱/۲	۲۰/۳۳ ^a ±۰/۶۶	۱۸/۳ ^a ±۰/۸۸

داده‌ها شامل میانگین ± انحراف معیار است. ارقام نشانه‌گذاری شده با حروف مختلف لاتین اختلاف معناداری در سطح (آزمون توکی $p < 0/05$) دارند. تیمار ۱ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^۷ کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی. تیمار ۲ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی. تیمار ۳ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید اضافه ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی

نتایج شمارش باکتریایی روده

آنها افزایش یافته و بین تیمارهای بررسی شده و تیمار شاهد اختلاف معناداری دیده شد ($p < 0/05$). همچنین شمارش کلی باکتریایی نیز بین تیمارها در پایان دوره پرورش دارای اختلاف معناداری بود ($p < 0/05$).

نتایج شمارش باکتریایی روده در جدول ۵ آمده است. باکتری‌های اسید لاکتیک در ابتدای دوره پرورش در روده بچه ماهی سفید دیده نشد، اما در پایان دوره پرورش تعداد

جدول ۵ مقایسه کشت باکتریایی روده بچه ماهی سفید دریای خزر در تیمارهای استفاده شده (لگاریتم کلنی بر گرم روده)

تیمارها	ابتدای دوره	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم
باکتری‌های اسید لاکتیک	صفر	۲/۲ ^a ±۰/۰۶	۵/۲ ^c ±۰/۰۴	۴ ^b ±۰/۰۳	۵ ^c ±۰/۰۸
شمارش کلی	۵±۰/۱۸	۶ ^a ±۰/۰۳	۷ ^b ±۰/۰۷	۶/۹ ^b ±۰/۰۳	۶/۱ ^a ±۰/۰۵

داده‌ها شامل میانگین ± انحراف معیار است. ارقام نشانه‌گذاری شده با حروف مختلف لاتین اختلاف معنادار در سطح (آزمون توکی $p < 0.05$) دارند.

تیمار ۱ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^۷ کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۲ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید حاوی ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی.

تیمار ۳ شامل نیم درصد فروکتوالیگوساکارید اضافه ۱۰^۷ کلنی بر گرم لاکتوکوکوس لاکتیس و ۱۰^{۱۰} کلنی بر گرم پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی

بحث

در این مطالعه ترکیب سینبیوتیک مصرفی بر روی

ترکیب شیمیایی بدن بچه ماهی سفید اثرهای معناداری گذاشته است به طوری که در تیمار ۳ تفاوت معناداری بین میزان پروتئین لاشه با سایر تیمارها دیده شد. در سایر تیمارها با وجود افزایش میزان پروتئین لاشه تفاوت معناداری با شاهد مشاهده نشد. به علاوه درصد چربی و خاکستر لاشه نیز اختلاف معناداری را نشان نداد. در مطالعه بر روی تغذیه گونه‌ای از خانواده خرگوش ماهیان (*Siganus rivulatus*) با ترکیب تجارتي با نام بیورژن که حاوی قند فروکتوالیگوساکارید و باکتری باسیلوس سابتلیس بود، درصدهای صفر تا ۲، تأثیری معناداری بر پروتئین لاشه نداشت اما در درصدهای بالاتر این تأثیر معنادار بود (El-dakar et al., 2007). اگر چه کیفیت هضم و جذب غذا با میزان تبدیل آن به پروتئین بستگی دارد (Ghosh et al., 2004)، اما شرایط پرورش، میزان جذب و دریافت روزانه غذا، فعالیت آنزیمی و میکروبی دستگاه گوارش و کیفیت هضم نیز در این خصوص مؤثر است.

نتایج این تحقیق نشان داد که شاخص‌های خونی شامل سطح گلبول سفید و قرمز و میزان هموگلوبوبین، هماتوکریت در تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معناداری نداشته است. مشابه این تحقیق در مطالعه بر روی تأثیر مانان الیگوساکارید بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان Sado et al., 2008) نیز دیده شده است. در مطالعه تأثیر

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب سینبوسیس مورد استفاده بر روی افزایش وزن و طول نهایی، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی بچه ماهی سفید دریای خزر اثر معناداری داشته است. نتایج مشابه درباره اثرهای سینبوسیس بر عملکرد شاخص‌های رشد خرگوش ماهی (*Siganus rivulatus*) (El-Dakar et al., 2007)، لابستر اروپایی (*Homarus gammarus*) (Daniels et al, 2010) و میگوی وانامی (Lin et al, 201) نیز گزارش شده است.

بهبود رشد حاصل از اثر سینبوسیس در آبزیان به اثر افزایشی این ترکیبات بر جمعیت باکتری‌های مفید روده، میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و همچنین تأثیر آن بر بهبود ساختار روده و پرزهای آن نسبت داده می‌شود. نتیجه این امر بهبود هضم و جذب ترکیبات مغذی مانند ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و سایر مواد مغذی است که در نهایت شاخص‌های رشد افزایش می‌یابد (Ye et al., 2011). در این باره افزایش قابلیت هضم و بالا رفتن ظرفیت جذب ترکیبات غذایی به ویژه پروتئین‌ها به افزایش کارایی پروتئین مصرفی کمک کرده و تبدیل پروتئین به گوشت را نیز بهبود می‌بخشد (Ghosh et al., 2004). به نظر می‌رسد نوع، مقدار و ترکیب پروبیوتیک یا پریبیوتیک مصرفی، گونه، شرایط محیطی و مدت زمان استفاده از شاخص‌های مؤثر در اثربخشی یک سینبیوتیک است.

گیرنده‌های ایمنی ماهی را برای ترشح ترکیبات ایمنی همچون لیزوزیم تحریک می‌کنند (Sado et al., 2014). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد با توجه به آنکه لوکوسیت‌های خون، منشأ تولید لیزوزیم‌های سرم در ماهی است بنابراین نبود تفاوت در میزان لوکوسیت‌ها در این مطالعه، دلیل عدم ایجاد اختلاف در میزان لیزوزیم خون است. به هر حال افزایش غیرمعناداری در میزان لکوسیت‌ها و لیزوزیم سرم در تیمارها در مقایسه با شاهد دیده شد. میزان لیزوزیم بسته به شرایط استرس (تراکم، کیفیت آب، دستکاری)، فصل، جنسیت، مراحل رسیدگی جنسی، دمای آب و تغذیه مقادیر متفاوتی در ماهیان خواهد بود (Saurabh., 2008). ایمونوگلوبولین‌ها به همراه لکتین‌ها در حذف پاتوژن‌ها در بدن نقش دارند که در این بین ایمونوگلوبولین‌ها ظرفیت بالاتری در حذف پاتوژن‌ها داشته و اختصاصی‌تر نیز عمل می‌کنند. ترکیباتی مانند پروبیوتیک‌ها یا سینبیوتیک‌ها با ایجاد تنوع گونه‌ای و یا افزایش نوع خاصی از باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش آبزیان مانند باکتری‌های اسید لاکتیک به تحریک سیستم ایمنی ماهی نیز کمک خواهند کرد. سازوکار عملی در این خصوص نیاز به مطالعات مولکولی خاص دارد (Mourino et al., 2012) اما به وجود ترکیبات خاص لیپوپلی ساکاریدی در دیواره این باکتری‌ها که تأثیر تحریک‌کنندگی بر سیستم ایمنی دارد، نیز نسبت داده می‌شود (Solimani et al., 2012). باید توجه داشت که تأثیرگذاری سینبیوسیس در تیمارها بسته به نوع و میزان فروکتوالیگوساکارید، نوع پروبیوتیک، گونه ماهی و یا شرایط محیطی متغیر خواهد بود.

بیشتر میکروب‌ها در دستگاه گوارش آبزیان بر خلاف جانوران خشک‌زی استقرار پایداری در دستگاه گوارش آنها نداشته و به حالت گذری (Transit) خود را نشان می‌دهند که شاید به دلیل خونسرد بودن این موجودات و تأثیر

سینبیوسیس ترکیب *Bioimin imbo* روی شاخص‌های خونی فیل ماهی نیز تأثیر معناداری بر لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، همتوکریت و گلبول قرمز دیده نشد، اما تعداد گلبول سفید و هموگلوبولین تفاوت معناداری را نشان دادند (Akrami et al., 2015). شاخص‌های خونی در ارزیابی عملکرد فیزیولوژیکی آبزیان و عوامل استرس‌زا در تغییر آنها نقش مهمی دارند. به هر حال افزایش معنادار در میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین در تیمار ۱ در مقایسه با شاهد می‌تواند بیانگر اثر مثبت باشد. به علاوه نبود اختلاف معنادار در میزان لیزوزیم در بین تیمارها و نیز با شاهد، با تغییرات جمعیت لکوسیتی هم‌خوانی دارد. در مطالعه‌ای تأثیر اینولین حاوی پروبیوتیک *Weissella cibaria* به صورت جداگانه و توأم بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی گونه *Pseudoplatystoma* مشخص شد که این ترکیب بر لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، همتوکریت، گلوکز، پروتئین و لیزوزیم تأثیر معناداری در مقایسه با شاهد نداشته، اما میزان ایمونوگلوبولین افزایش یافته بود (Mourino et al., 2012). در مطالعه دیگری تأثیر پروبیوتیک باسیلوس سابتلیس در ماهی هامور (*Larimichthys crocea*)، میزان لیزوزیم سرم افزایش معناداری نسبت به شاهد داشته، اما استفاده از فروکتوالیگوساکارید به صورت جداگانه و همچنین تلفیق فروکتوالیگوساکارید با باسیلوس سابتلیس اختلاف معناداری نشان نداد (Ai et al., 2011). همچنین در مطالعه اثر پروبیوتیک تجارتي پریمالاک (Imanpoor et al., 2015) در بچه ماهی سفید دریای خزر نیز تفاوت معنادار در مقدار پروتئین خون دیده نشد، اما استفاده از باکتری *Lactobacillus rhamnosus* با دوز بالا موجب افزایش معنادار لیزوزیم در ماهی قزل‌آلا شده است (Panigrahi., 2004). نشان داده شد که پروبیوتیک‌ها

گوارش افزایش معناداری را نشان داده است. در مجموع استفاده از پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید به همراه پروبیوتیک‌های مورد مصرف در این مطالعه در تغییر و استقرار بیشتر و بهتر باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهی سفید دریای خزر تأثیر معناداری داشته است. جمع‌بندی کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیب سین بیوتیکی استفاده شده در این مطالعه بر روی شاخص‌های رشد، ایمنی و ترکیب باکتریایی دستگاه گوارش لارو بچه ماهی سفید دریای خزر تأثیر مثبتی داشته است. به هر حال مطالعات بیشتر با استفاده از مقادیر متفاوت این ترکیبات بر روی این گونه تجارتي پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران و با حمایت قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام شده است. از زحمات آقای مهندس باقری کارشناس محترم آزمایشگاه باکتری‌شناسی ماهیان و کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی دکتر رستگار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و همچنین مهندس خمیرانی ریاست محترم کارگاه تکثیر و بازسازی ذخایر شهید انصاری رشت و سایر کارشناسان و زحمات‌کشان این مجموعه کمال تشکر و امتنان را دارد.

منابع

Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J. and 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.

تغییرات دمایی یا شوری و فشار اسمزی نشأت گرفته از چنین حالتی بر روی باکتری‌های ورودی به دستگاه گوارش باشد (Panigrahi.,2004). فروکتوالیگوساکارید ترکیبی است که در برابر آنزیم‌های گلیکولیتیک دستگاه گوارش مقاوم بوده و باعث افزایش تعداد و تنوع باکتری‌های کلون می‌شود (Oku et al., 1984). این قند در صورتی که با پروبیوتیک مصرف شود، می‌تواند در افزایش تعداد باکتری‌های روده و باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر باشد (Roberfroid, 1998) و جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک روده را نیز افزایش دهد (Mourino et al., 2012). در این مطالعه تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک دستگاه گوارش لارو ماهی سفید دریای خزر متأثر از نوع تیمارها به طور معناداری بیشتر از شاهد بوده است. به نظر می‌رسد تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مانند اسید استیک، پروپیونیک و بوتریک ناشی از تخمیر فروکتوالیگوساکارید محیط را برای رشد بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک فراهم می‌کند و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به شاهد افزایش بیشتری را از خود نشان داده است. شمارش کلی باکتری‌ها نیز در تیمارها تفاوت معناداری را نشان داده است. این در حالی است که تعداد آن در تیمارهای ۱ و ۲ بیشتر از شاهد و تیمار ۳ است. تغییر در شمارش کلی ممکن است ناشی از شرایط محیطی و تغذیه‌ای باشد. در مطالعات مشابه نیز این حالت گزارش شده است. برای مثال در مطالعه‌ای تأثیر توأم فروکتوالیگوساکارید به همراه باکتری *Lactobacillus paracasei* در خوک (Bomba et al.,2002) تأثیر توأم پروبیوتیک *Bacillus spp.* و مانان الیگوساکارید بر روی لارو لابستر (*Homarus gammarus* Daniel et al.,2010)، استفاده از گلوکان در ماهی سفید دریای خزر (Roufchaie et al.,2012) نیز تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک دستگاه

- Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M. A., Merrifield, D. L. and Ringø, E. (2015).** In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*. JohnWiley&SonsLtd
- Imanpoor, M. R. and Roohi, Z. 2015.** Effect of a multi-strain probiotic (Primalac) on growth performance, some blood biochemical parameters, survival and stress resistance on Caspian kutum (*Rutilus kutum*) fry. *Iranian Scientific Fisheries Journal*.24(2):95-102 (Abstract in English)
- Li, J., Tan, B. and Mai, K. 2009.** Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291:35-40.
- Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., Luo L. and Pan, Y. 2012.** Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342–343 : 36–41.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Kumar, K., Prasad, K. P. and Mohanta, K. N. 2012.** Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104 : 28–37.
- Mourino, J. L. P., Vieira, F. D. N., Jatoba, A. B., DaSilva, B. C., Jesus, G. F. A., Seiffert, W. Q. and Martines, M. N. 2012.** Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp. *Aquaculture Nutrition*, 18:73–80.
- Nayak, S. K., Swain, P. and Mukherjee, S. C. 2007.** Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:892–896.
- Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoga N. 1984.** Nondigestibility of a new sweetener 'Neosugar' in the rat. *Journal of Nutrition*. 114:1574–151.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. 2004.** Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus*
- AOAC. 1990.** Official Methods of Analysis. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists Inc. Arlington, Virginia.
- Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P. and Mudronova, D. 2002.** Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 88(1):95-99.
- Bandyopadhyay, P., Pradeep, K. and Mohapatra, D. 2009.** Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35:467–478.
- Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R. and Arnold, K.E. 2010.** Effect of dietary *Bacillus spp.* and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus L.*) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304: 49–57.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R. and Beev, G. 2009.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*, 1: 1-29.
- El-Dakar, A.Y., Shalaby, S. M. and Saoud, J. P. 2007.** Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13:407–412.
- Firouzbakhsh, F., Mehrabi, M., Heydari, M., Khalesi, M. and Tajick, M. A. 2014.** Protective effects of a synbiotic against experimental *Saprolegnia parasitica* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 45: 609–618.
- Ghosh, K., Shina, A. and Sahu, C. 2008.** Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, 14: 289–299.
- Haghighi, D. T., Fallahi, M., Abdollahi, Y. 2010.** The effect of different levels of Biomin Imbo synbiotic on growth and survival of *Rutilus frisii kutum* fry. *Journal of Fisheries Islamic Azad University, Azadshahr Branch*, 4(3):1-15

(*Rutilus frisii kutum*, kamensky 1901) *Journal of Fisheries*, Islamic Azad University, Azadshahr Branch, 5(1):107-117. (in Persian)

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

Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M., Hassan Abadi, Z., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 316-321

Ye, J. K., Wang, F. and Li, Y. 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*. *Aquaculture Nutrition*, 17: 902-911.

Yousefian, M., Hedayatifard, M., Fahimi, S., Shikholeslami, M., Irani, M., Amirinia, C. and Mousavi, S.E. 2012. Effect of Prebiotic Supplementation on Growth Performance and Serum Biochemical Parameters of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) Fry. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(8) : 684-692.

mykiss induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102: 379 – 388.

Roberfroid, M. B. 1998. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*, 80(2):197 –202.

Roufchaie, R., Hoseinifar, S. H., Zamini, A., Borani, M. S., Kohan, H. M. and Faied, M. 2012. Effects of glucan on growth performance, carcass composition and intestinal microbiota in *Rutilus frisii kutum* fingerling. *Journal of Fisheries Science and Technology (JFST)*. 2(1):43-54 (Abstract in English)

Sado, R.Y., Bicudo, A. J. A. and Cyrino, J. E. P. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* have no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6): 821-826.

Sado, R.Y., Bicudo, A. J. A. and Cyrino, J. E. P. 2014. Hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed graded levels of mannan oligosaccharides (MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(1): 30-39

Saurabh, S and Shao, P. K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39:223-239

Shahkar, M., Khara, H. and Sudagar, M. 2011. Effects of increase diet protein on feeding frequency and growth and survival of Caspian kutum larvae



Study of combined effect of fructo-oligosaccharid with *Pediococcus acidilactici* and *Lactococcus lactis* as probiotics on some growth performance, haematology and intestine bacterial flora of *Rutilus frisii kutum* larva

Mehdi Soltani*¹, Seyed Saeed Mirzargar¹, Gholamreza Badzohreh¹, Mehrdad farhangi², Alireza Valipour

1- Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Associate Prof., Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- PhD Student, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Associate Prof., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5- Assistant Prof., Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali, Iran

Accepted: 03.01.2016

Received: 09.04.2016

*Corresponding author: msoltani@ut.ac.ir

Abstract:

The purpose of this study was to determine the effect combined application of dietary Fructooligosaccharid (FOS) and *Pediococcus acidilactici* plus *Lactococcus lactis* on some growth performance, haematological parameters and intestinal microbiota of *Rutilus frisii kutum*. According to the bacterial growth in *in vitro* condition and production of volatile fatty acid (VFA), three treatments consisting of (Treat1): 0.5% FOS plus 10^{10} cfu/g *Lactococcus lactis* and 10^7 cfu/g *Pediococcus acidilactici*, (Treat2): 0.5% FOS plus 10^{10} cfu/g *Lactococcus lactis* and 10^{10} cfu/g *Pediococcus acidilactici* and (Treat3): 0.5% FOS plus 10^7 cfu/g *Lactococcus lactis* and 10^{10} cfu/g *Pediococcus acidilactici* were used in 400 Kutum fry weighing 0.75 ± 0.02 g obtained from a reproduction fish center, Guilan Province Iran. Fish were kept in 1000 L water and fed on experimental diet for 60 days. Results showed that growth indices such as final weight (FW) and specific growth rate (SGR) were significantly increased in all treatment groups compared to control one ($p < 0.05$). Also, FCR in all treatments were lower than control one. In treatment 1, final weight (1.67), SGR (1.34) and FCR (2) were significantly higher than other treatments. The results showed that hematological parameters values in different treatments showed no significant differences ($p > 0.05$). However, immunoglobulin level in treatment 1 (22.33mg/ml) was significantly higher than other treatments. The total lactic acid bacteria counts in treatment 1 (5.2) and treatment 3 (5) was significantly higher than other treatments ($p < 0.05$). The present findings show that the combined application of probiotics and prebiotics could be a useful tool in the rearing of early stages of *Rutilus frisii kutum* fry.

Key word: *Rutilus frisii kutum* fry, Symbiosis, growth, Intestinal microbiota