تأثیر استفاده از سین‌بیوتیک با سطوح مختلف بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید به همراه *لاکتوباسیلوس کازئی* بر فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی کپورمعمولی (*Ciprinus carpio*)

- **مهدیه نصیرپور**: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ١٣٥
- **تکاور محمدیان***: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ١٣٥
- **محمدرضا تابنده**: گروه علوم‌پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ١٣٥
- **مهرزاد مصباح**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، صندوق‌پستی: ١٣٥

تاریخ دریافت: تیر ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: مهر ١٣٩٤

چکیده

سین‌بیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی هستند که ترکیبی از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها می‌باشند، از این رو سین‌بیوتیک‌ها اثرات مفید بیش‌تری دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر سطوح مختلف پربیوتیکی بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید (ایمنوژن) به‌همراه لاکتوباسیلوس کازئی PTCC ١٦٠٨ بر آنزیم‌های گوارشی ماهی کپورمعمولی بود. این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی، شامل سه سطح ٠/٥(A)، ١(B) و ١/٥ (C) درصد پربیوتیک ایمنوژن به‌همراه لاکتوباسیلوس کازئی 5×10^{7} $CFU\ g^{-1}$ در هر گرم خوراک پایه، گروه لاکتوباسیلوس کازئی به تنهایی و گروه شاهد بدون مکمل غذایی در قالب ٥ تیمار با سه تکرار طراحی شد. ٣٠٠ بچه‌ماهی با میانگین وزن ٥±٦٥ گرم و تراکم ٢٠ عدد در مخازن پلی‌اتیلنی به‌مدت ١١ هفته با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان (٣ قطعه از هر تکرار)، در روز صفر (اول شروع آزمایش)، ٣٠ ، ٦٠ و ٧٥ (١٥ روز قطع مکمل غذایی) انجام شد. نتایج فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه‌ماهیان کپور نشان داد، فعالیت آنزیم‌های تریپسین و پروتئاز، آلفا-آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز به‌طور قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($p<0/05$). نتایج این مطالعه نشان داد، سطوح مختلف ایمنوژن در ترکیب سین‌بیوتیک قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر افزایش کارایی دستگاه گوارش به‌لحاظ جایگزینی پروبیوتیکی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی دارد و این سین‌بیوتیک در غلظت یک درصد ایمنوژن می‌تواند به‌عنوان مکمل مناسبی برای جیره غذایی کپور معمولی باشد.

کلمات کلیدی: سین‌بیوتیک، رشد، بازماندگی، فلور باکتریایی، آنزیم‌های گوارشی، کپورمعمولی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: takavar_m٢٠٠٢@yahoo.com

مقدمه

مصرف آبزیان با افزایش رشد چشمگیری همراه بوده است به‌طوری‌که در سال ۱۹۹۸، ۱۰ درصد، در سال ۲۰۰۲، ۳۴ درصد و در سال ۲۰۱۰، ۴۸ درصد مصرف غذایی جهان به محصولات آبزیان اختصاص داشته است (FAO، ۲۰۱۴). به موازات افزایش آگاهی از ارزش غذایی و بهداشتی ماهی به‌خصوص نقش آن در کاهش کلسترول خون، انتظار می‌رود که در آینده تقاضا برای مصرف آن افزایش یابد. لذا با توجه به شرایط کنونی که مزارع پرورش ماهی، خصوصاً ماهیان گرمابی در حال افزایش می‌باشند، لزوم افزایش دانش و آگاهی در مورد فن‌آوری زیستی این نوع ماهیان الزامی به‌نظر می‌رسد. ماهی کپور یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی آب شیرین در جهان محسوب می‌شود که تقریباً با تولید سالانه ۴ میلیون تن حدود ۱۴ درصد کل تولید ماهیان پرورشی آب شیرین را شامل می‌شود (FAO، ۲۰۱۴). در حال حاضر هدف از آبزی‌پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید، برای بهینه‌سازی سودآوری می‌باشد. از بزرگ‌ترین مسائل پیش رو در صنعت آبزی پروری، یافتن راه حل‌هایی جهت بالا بردن تولید در واحد هکتار است. غذا به‌عنوان هزینه اصلی در پرورش نیمه‌متراکم ماهیان گرمابی، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در توانایی ماهی برای رسیدن به رشد مطلوب و سلامت ماهی است.

همگام با توسعه صنعت آبزی‌پروری، مطالعات جدیدی در زمینه تغذیه گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی صورت گرفته است. بررسی فن‌آوری‌های جدید بر روی گونه‌های پرورشی مرسوم، جهت بالا بردن توان تولید و بازماندگی، رسیدن به این هدف را نزدیک‌تر و متمرکزتر می‌کند. از دستاوردهای جدید علم تغذیه در صنعت دام، طیور و آبزیان به‌منظور افزایش بهره‌وری اقتصادی، استفاده از مکمل‌های غذایی سین‌بیوتیکی (حاوی ترکیبی از پروبیوتیک و پربیوتیک) است که بهبوددهنده رشد و سلامت جاندار می‌باشند (محرابی و همکاران، ۱۳۸۹). تحقیقات در زمینه تغذیه ماهی کپور، در دهه‌های اخیر بسیار صورت گرفته است اما اخیراً استفاده از مکمل‌های جدید غذایی مانند پربیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها بر روی رشد، کارایی غذا و تولید آنزیم‌های گوارشی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سین‌بیوتیک‌ها هنگامی‌که به‌عنوان مکمل غذایی استفاده شوند اثرات بسیار مفیدی برای میزبان دارند مانند استقرار باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش که باعث بهبود عملکرد گوارش، بهبود ساختار دستگاه گوارش و تولید آنزیم‌ها و مواد جلوگیری کننده و در نهایت بهبود هضم و جذب مواد غذایی در ماهی شوند (Kasarcodi-watson و همکاران، ۲۰۰۸؛ Balcazar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Veschuere و همکاران، ۲۰۰۰). *لاکتوباسیلوس کازئی* یکی از باکتری‌های پروبیوتیکی است که پتانسیل کاربردی ویژه‌ای در آبزیان دارد که می‌تواند در جذب مواد مغذی و چسبندگی در دستگاه گوارش در برابر پاتوژن‌ها به رقابت بپردازد (Millette و همکاران، ۲۰۰۷).

استفاده از پربیوتیک‌ها به‌عنوان مواد مغذی غیرقابل هضم در سطوح بالای دستگاه گوارش که به‌طور مؤثری سلامتی میزبان را از طریق تحریک و یا محدودکردن رشد باکتری‌های موجود در روده تحت تأثیر قرار می‌دهند، ایده جدیدی بوده که در آبزی‌پروری شکل گرفته است. ایمونوژن پری‌بیوتیکی تجاری است ساخت شرکت ICC که محصول یک ترکیب طبیعی شامل چندین ماده محرک مانند بتاگلوکان و مانان‌الیگوساکارید می‌باشد که به‌عنوان مکمل غذایی در آبزی‌پروری مورد استفاده قرارمی‌گیرد. مانان‌الیگو ساکارید ترکیب گلوکومانوپروتئینی مشتق‌شده از دیواره سلولی مخمر *ساکرومایسیس سرویسیه* است و بتاگلوکان ترکیب کربوهیدراته مشتق‌شده از مخمر قارچ می‌باشد (Welker و همکاران، ۲۰۰۷). مکمل مانان‌الیگوساکارید در جیره غذایی ماهیان به‌عنوان یک بهبوددهنده سلامتی و عملکرد رشد به اثبات رسیده است (Ebrahim و همکاران، ۲۰۱۱؛ Burr و همکاران، ۲۰۰۸؛ Staykov و همکاران، ۲۰۰۷؛ Torrecillas و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین به‌عنوان اصلاح‌کننده میکروفلور دستگاه گوارش (Salz و همکاران، ۲۰۰۸؛ جافرنوده، ۱۳۸۹) و اصلاح‌کننده میکروفلور روده شناخته شده است. آنزیم‌های گوارشی یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در کاربرد خوراک در ماهیان محسوب می‌شود که این آنزیم‌ها در مورد میزان هضم غذا از طریق هیدرولیز کربوهیدرات‌ها، پروتئین و لیپید موجود در خوراک برای ماهی اطلاعات مهمی می‌دهد (Lemieux، ۱۹۹۹). آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد ماهیان در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفتند (Das و Chan، ۲۰۰۸؛ Jun-sheng و همکاران، ۲۰۰۶؛ Bezzerra و همکاران، ۲۰۰۵؛ Hidalgo و همکاران، ۱۹۹۹؛ Kawai و Ikeda، ۱۹۷۲). هرچند اطلاعات در مورد آنزیم‌های خارج سلولی که به‌وسیله باکتری‌های روده تولید می‌شوند و اهمیت بیوشیمیایی آن‌ها، هم‌چنان محدود می‌باشد (Bairagi، ۲۰۰۲). باتوجه به کمبود اطلاعات در مورد استفاده از سین‌بیوتیک‌ها در ماهیان ایران و جهان و افزایش گرایش به استفاده از این مواد در آبزی‌پروری در کل جهان، بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تأثیر سطوح مختلف پربیوتیکی (ایمنوژن) به‌همراه *لاکتوباسیلوس کازئی* بر آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی: تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی با وزن ابتدایی ۵±۶۵ گرم از مرکز تکثیر شهید ملکی برای این تحقیق تهیه شد و با ماشین مخصوص حمل ماهی زنده به سالن آکواریوم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران منتقل گردیدند. ماهی‌ها دو هفته قبل از آغاز مطالعه با شرایط بخش سازگار شدند.

تیماربندی ماهیان: بچه‌ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به ۵ تیمار در سه تکرار تقسیم شده، به‌طوری‌که هر تکرار شامل ۲۰ قطعه بچه‌ماهی بود. طول دوره تحقیق یازده هفته بوده و در روزهای ۰، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ ماهی‌ها زیست‌سنجی شده و آنزیم‌های گوارشی آن‌ها بررسی شدند.

جدول۱: نحوه گروه‌بندی تیمارهای آزمایشی

نام گروه	نوع غذا	تعداد ماهی
تیمار (A)	*لاکتوباسیلوس کازئی* 5×10^{7} CFU و ۰/۵درصد ایمونوژن در هر گرم خوراک	۲۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار (B)	*لاکتوباسیلوس کازئی* 5×10^{7} CFU و ۱ درصد ایمونوژن در هر گرم خوراک	۲۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار (C)	*لاکتوباسیلوس کازئی* 5×10^{7} CFU و ۱/۵درصد ایمونوژن در هر گرم خوراک	۲۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار (D)	5×10^{7} CFU پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* در هر گرم خوراک	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
شاهد (E)	بدون مکمل پروبیوتیکی	۲۰ قطعه (در سه تکرار)

نحوه افزودن پربیوتیک و پروبیوتیک به جیره پایه آزمایشی: ابتدا مواد خشک غذا (ساخت کارخانه تولید خوراک آبزیان تعاونی ۲۱ بیضاء حاوی پروتئین خام: ۳۷-۳۵، چربی خام: ۹-۷، انرژی قابل هضم: ۴۰۰۰-۳۸۰۰) و پری‌بیوتیک ایمونوژن با نسبت‌های از پیش تعیین شده جهت گروه‌های آزمایشی به‌وسیله ترازوی دیجیتال توزین و به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌وسیله هم‌زن برقی مخلوط شدند. سپس جهت آماده‌سازی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC۱۶۰۸) و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط (Planas و همکاران، ۲۰۰۴؛ Vine و همکاران، ۲۰۰۴) استفاده گردید. به‌طور خلاصه برای هر تیمار از باکتری به‌طور جداگانه در محیط آب‌گوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شست و شو می‌گردند و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها بر روی 3×10^{9} CFU/ml تنظیم خواهد شد، سپس غلظت 5×10^{7} CFU/ml باکتری به هر گرم غذای تیمارها اسپری گردید. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گردید. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد.

تغذیه بچه‌ماهی‌ها با تیمارهای آزمایشی: پس از ذخیره سازی بچه ماهی‌ها در مخازن مورد نظر، تمامی تیمارها به‌مدت ۱۰ روز جهت سازگاری با شرایط جدید با جیره پایه تغذیه شدند. پس از گذشت ۱۰ روز و عملیات زیست‌سنجی تغذیه تیمارها با جیره‌های اختصاصی آغاز گردید. غذادهی به‌صورت دستی و ۳ بار در روز در ساعات ۸، ۱۳ و ۱۸ تا حد سیری انجام می‌گرفت. کلیه تیمارها به‌مدت ۶۰ روز و مطابق برنامه مذکور غذادهی شدند و بعد از آن تمامی تیمارهای سین‌بیوتیکی و پروبیوتیکی به‌مدت دو هفته با غذای پایه (بدون مکمل) تغذیه شدند.

انجام مراحل نمونه‌گیری از دستگاه گوارش: نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان، در روز صفر (اول شروع آزمایش)، ۳۰،۶۰ و ۷۵ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبد گشایی آن‌ها صورت گیرد (Chang و همکاران، ۲۰۰۲). سپس بلافاصله در دمای ۱۹۶-درجه سانتی‌گراد (مخزن ازت مایع) نگه‌داری شدند (Kuzminaو همکاران، ۲۰۱۰).نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از مخزن ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به‌داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی-حجمی) محلول بافر هموژن برروی نمونه ریخته شد. نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی هموژن شدند (Cahu و همکاران،۱۹۹۹).

سنجش آنزیم‌های گوارشی- تهیه عصاره آنزیمی: برای ساخت بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، پروتئاز،آلفا-آمیلاز و لیپاز)، Tris-Hcl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton ۱۰۰X ۰/۱ درصد در pH ۷/۸ ترکیب گردید. سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند، نمونه‌های هموژن‌شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به‌داخل اپندورف‌ها ریخته‌شده و سپس داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (Rungruangsak و همکاران، ۲۰۰۲؛ Cahu و همکاران، ۱۹۹۹).

استخراج آنزیم روده‌ای: برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سردمانیتول ۵۰میلی‌مولار، بافر Tris HCl- ۲ میلی‌مولار در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی-حجمی استفاده گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (Carne و همکاران، ۱۹۷۹). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، کلریدکلسیم ۰/۱ مولار به هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دور ۹۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: فعالیت ۵ آنزیم گوارشی آلفا-آمیلاز، تریپسین، پروتئاز، لیپاز، آلکالین فسفاتاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جایی‌که آنزیم‌ها ساختار پروتئینی داشته و در دسته پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، لذا محاسبات فعالیت آنزیمی بیش‌تر براساس پروتئین محلول انجام گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم ترپسین، از سوبسترای N- بنزوئیل -L-آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N-بنزوئیل-L-آرژنین تبدیل می‌شود. نتایج در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت نوری صورت گرفت (Worthington، ۱۹۹۱). ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰ میکرولیتر از اسیدکلریدریک ۱ میلی‌مول مخلوط و سپس برای همدمایی در دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به‌میزان ۳۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل ۲۸۰۲ UV) در طول موج ۲۵۳ نانومتر انجام شد.

برای سنجش آنزیم پروتئاز از روش Worthington (۱۹۹۱)، استفاده گردید. در این روش از کازئین به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم پروتئاز ۲ عدد لوله آزمایش، ۱عدد برای آزمایش و ۱ لوله هم جهت بلانک مشخص کرده و به هر لوله ۰/۰۵ میلی‌لیتر کازئین و ۱۰ میکرولیتر $CaCL_2$ اضافه کرده و سپس به لوله آزمایش ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید ولی به لوله بلانک چیزی اضافه نشد. سپس لوله‌ها را به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از این زمان به هر کدام از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۵٪ اضافه و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این زمان ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی را جدا کرده و سپس به هر لوله ۱ میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه کرده و درون کاوت ریخته و بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد.

برای تعیین فعالیت آلفاآمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایش و ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر نیز به لوله دیگری به‌عنوان شاهد وارد شد. سپس عمل انکوباسیون به‌مدت ۴-۳ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا به دمای تعادل برسند. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل انکوباسیون دقیقاً به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها از حمام خارج شده و در دمای اتاق خنک شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری انجام شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده، تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به‌دست آمد. واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، برحسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Worthington، ۱۹۹۱).

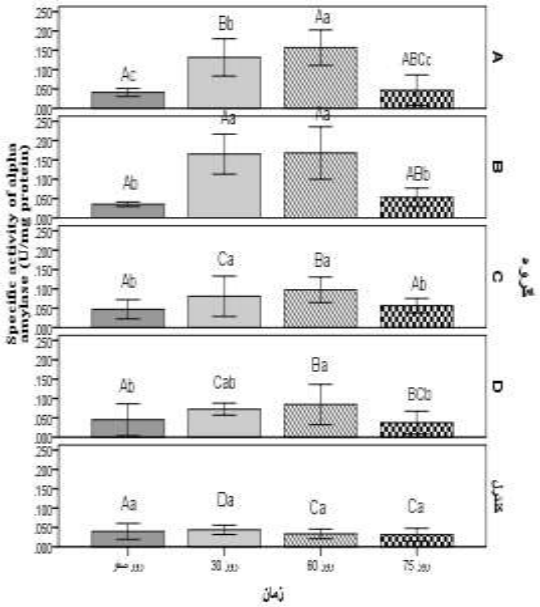
برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر Tris-Hcl ۰/۸ مولار، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ میلی‌مولار و معرف تیمول فتالئین ۰/۹ درصد استفاده شد. جهت سنجش این آنزیم از کیت آلکالین فسفاتاز (Ref:Zist Chem.۵۰۳-۱۰) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بی‌کربنات با یک قسمت محلول معرف Para-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط شد و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هم‌دمایی صورت گیرد. میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از این مخلوط را با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا انکوبه شود. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله آزمایش اضافه شد.

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز اطلاعات از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ استفاده شد و تأثیر سین‌بیوتیک و پروبیوتیک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی بین ۵ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه با

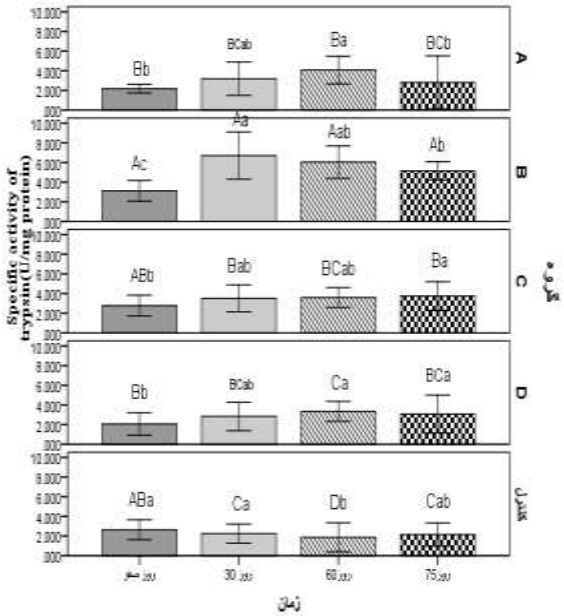
ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ درصد استفاده شد. هم‌چنین ترسیم نمودار از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ استفاده شد.

نتایج

آزمایشات ارزیابی آنزیم‌های گوارشی-بررسی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد تیمارهای سین‌بیوتیکی و تیمار کازئی (D) اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در روز ۳۰ (وسط دوره پرورش)، روز ۶۰ و روز ۷۵ با تیمار شاهد داشته است (p<۰/۰۵). در روز ۳۰ و ۶۰ تیمار B بیش‌ترین میزان فعالیت را نشان داده ۰/۱۶۵±۰/۰۲۶ و ۰/۱۶۸±۰/۰۳۳ و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵). در تمامی تیمارها به‌جز تیمار شاهد روند افزایشی از روز صفر تا روز ۶۰ مشاهده شد و پس از دوره قطع مکمل غذایی (روز ۷۵) کاهشی در روند میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز مشاهده شد اما در گروه B و C هم‌چنان اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد مشاهده گردید.



شکل ۱: فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ($U/mg\ protein.\ min^{-1}$) در تیمارهای مختلف در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۰/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار B: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار C: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک



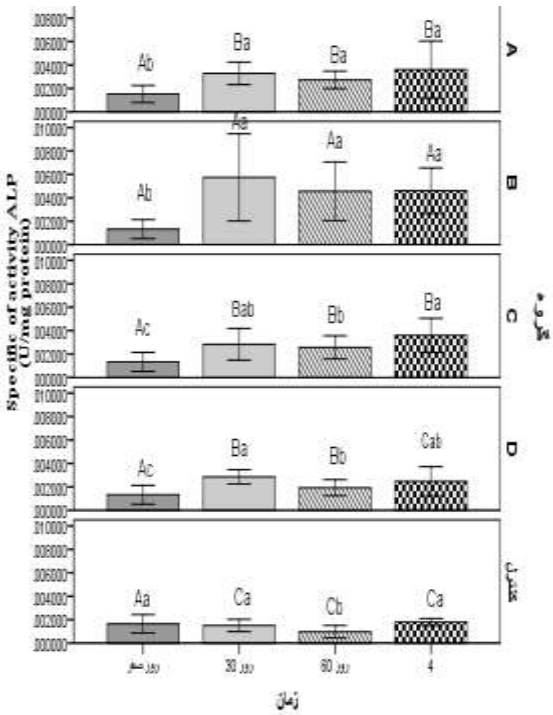
شکل ۲: فعالیت آنزیم تریپسین ($U/mg\ protein.\ min^{-1}$) در تیمارهای مختلف در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوسکازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۰/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار B: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوسکازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱٪٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار C: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوسکازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک

حروف غیرهمنام کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای نمونه‌گیری برای هر تیمار است و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در تیمارها در یک مرحله از نمونه گیری است.

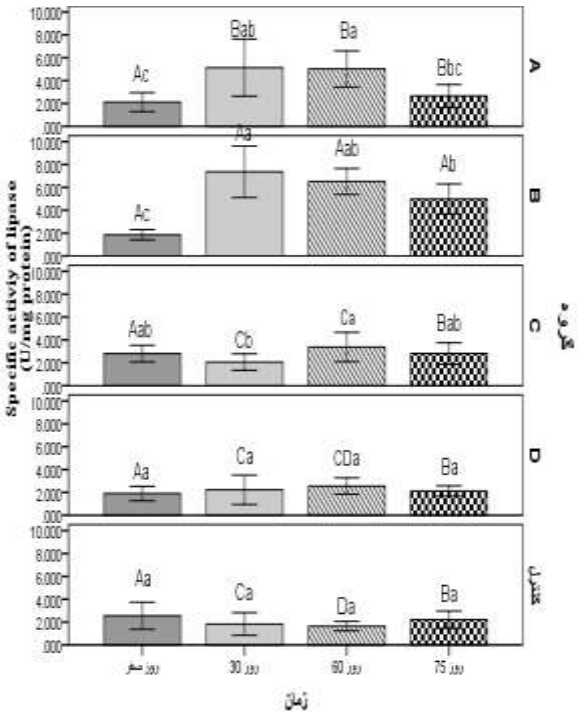
بررسی فعالیت آنزیم تریپسین: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش، تیمار B با بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین ۱/۲۰۳۰±۶/۷۰۵ و ۰/۸۲۵±۶/۰۴۴، با تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (p>۰/۰۵). هم‌چنین در روز ۳۰ تیمارهای A و D با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵). همه تیمارها در روز ۶۰ با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند (p<۰/۰۵).

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: نتایج نشان داد که در روز ۳۰ تیمار B و A به‌ترتیب بیش‌ترین میزان و در روز ۶۰ تیمار B بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را داشتند. در روز ۳۰ و ۶۰ تیمار B اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (p>۰/۰۵) از نکات قابل توجه نتایج به‌دست آمده در مورد سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، می‌توان به عدم کاهش فعالیت این آنزیم در تیمارهای سین بیوتیکی پس از دوره قطع مکمل غذایی و هم‌چنین کاهش میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای سین‌بیوتیکی در روز ۶۰ نسبت به روز ۳۰ اشاره کرد.

بررسی فعالیت آنزیم لیپاز: نتایج نشان داد که در روز ۳۰ تیمار B و A به‌ترتیب بیش‌ترین میزان و در روز ۶۰ تیمار B بیش‌ترین



شکل ۳: فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ($U/mg\ protein\ .\ min^{-1}$) در تیمارهای مختلف در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۰/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار B: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار C: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱/۵٪ ایمونوژن درهر گرم خوراک

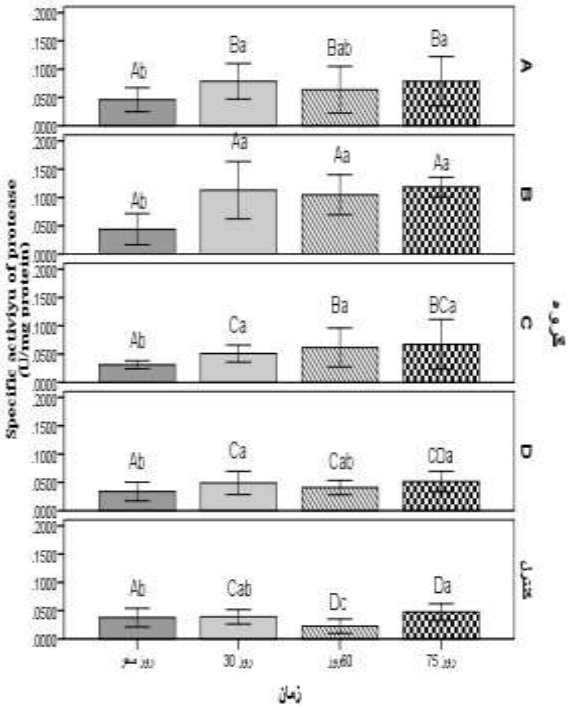


شکل ۴: فعالیت آنزیم لیپاز ($U/mg\ protein.\ min^{-1}$) در تیمارهای مختلف در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۰/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار B: تغذیه‌شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار C: تغذیه‌شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک

حروف غیرهمنام کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای نمونه‌گیری برای هر تیمار است و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در تیمارها در یک مرحله از نمونه گیری است.

میزان فعالیت آنزیم لیپاز را داشتند. در روز ۳۰ و ۶۰ تیمار B اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (p>۰/۰۵). از نکات قابل توجه از نتایج به‌دست آمده در مورد سطح فعالیت آنزیم لیپاز می‌توان به عدم کاهش فعالیت این آنزیم در تیمارهای سین‌بیوتیکی (به جز تیمار A) پس از دوره قطع مکمل غذایی اشاره کرد.

بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز: نتایج نشان داد که در روز ۳۰ تیمار B و A به‌ترتیب بیش‌ترین میزان و در روز ۶۰ تیمار B بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز را داشتند. در روز ۳۰ و ۶۰ تیمار B اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (p>۰/۰۵) از نکات قابل توجه از نتایج به‌دست آمده در مورد سطح فعالیت آنزیم پروتئاز می‌توان به عدم کاهش فعالیت این آنزیم در تیمارهای سین‌بیوتیکی پس از دوره قطع مکمل غذایی اشاره کرد.



شکل ۵: فعالیت آنزیم پروتئاز (U/mg protein. min-۱) در تیمارهای مختلف در روزهای ۰، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش؛ تیمار کنترل (فاقد مکمل غذایی)، تیمار A: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۰/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار B: تغذیه‌شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک، تیمار C: تغذیه شده با خوراک حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* ۵×۱۰^{۷} و ۱/۵٪ ایمونوژن در هر گرم خوراک

حروف غیرهمنام کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای نمونه‌گیری برای هر تیمار است و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در تیمارها در یک مرحله از نمونه‌گیری است.

بحث

ماهی کپور یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی آب شیرین در جهان محسوب می‌شود که تقریباً با تولید سالانه ۴ میلیون تن حدود ۱۴ درصد کل تولید ماهیان پرورشی آب شیرین را شامل می‌شود. در پرورش چند گونه‌ای پرورش ماهیان گرمابی، کپور معمولی تنها گونه‌ای است که از غذای دستی استفاده می‌کند لذا گونه هدف مناسبی جهت مطالعات تغذیه‌ای محسوب می‌گردد. تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشد (Sunde و همکاران، ۲۰۰۴). از فعالیت آنزیم‌های هضمی به‌عنوان شاخصی جهت تفاوت‌های رشدی و مصرف غذا یاد می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر استفاده از پربیوتیک مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان با نام تجاری ایمنوژن به‌همراه با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* که یک پروبیوتیک پذیرفته‌شده آبزیان می‌باشد بر فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، تریپسین، پروتئاز، آلکالین فسفاتاز و لیپاز، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت این آنزیم‌ها در روزهای ۳۰، ۶۰ و حتی ۷۵ پرورش نسبت به تیمار شاهد بود.

تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، بهبود تعادل میکروبی روده و در نتیجه بهبود هضم، جذب و مصرف غذا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Suzer و همکاران، ۲۰۰۸). همین‌طور تأثیر پربیوتیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بررسی‌های محققین مختلف بر روی آبزیان دیده شده است (Soleimani و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، باکتری‌های مفید مستقر در دستگاه گوارش با شرکت در فرایند هضم، کارایی دستگاه گوارش را افزایش داده و در نهایت موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شوند. نتایج تحقیقاتی که در آن‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده شده، نشان داده است که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند (Wang و Xu، ۲۰۰۶)، لذا احتمالاً جمعیت باکتری‌های پروبیوتیکی که تحت تأثیر وجود پربیوتیک ایمنوژن در دستگاه گوارش ماهی کپور مطالعه حاضر استقرار یافته‌اند، توانسته‌اند به این وسیله سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره غذایی بچه‌ماهیان کپورمعمولی شوند چرا که فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و تریپسین که از پروتئازها هستند را افزایش دادند. موارد مشابهی از توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش میگوی چینی (Wang و همکاران، ۲۰۰۶)، ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*)

(Skrodenyte-Arbaciauskiene، ۲۰۰۷)، شانک (Suzer، ۲۰۰۸)، هامور (Sun و همکاران، ۲۰۱۱)، میگوی سفید هندی (Ziaei-Nejad و همکاران، ۲۰۰۶)، میگوی پاسفید غربی (Wang، ۲۰۰۷) و *آرتمیانا ارومیانا* (Ahmadnia و همکاران، ۲۰۱۱) گزارش شده است که همگی تأییدکننده نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم‌های گوارشی در کپورمعمولی می‌باشد. احتمالاً می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های افزایش یافته پروبیوتیکی تحت تأثیر پربیوتیک، توانایی بیش‌تری در تولید آنزیم‌های خارج سلولی پروتئاز، یا هضم و جذب بیش‌تر پروتئین‌ها و یا تحریک بیش‌تر دستگاه گوارش بچه‌ماهی کپورمعمولی نسبت به گروه شاهد و حتی گروه *لاکتوباسیلوس کازئی* (به تنهایی) داشته‌اند.

در بررسی Tovar-Ramírez و همکاران (۲۰۰۲) دیده شد افزودن پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces cervisiae* به جیره غذایی ماهی باس دریایی نه تنها تأثیری بر فعالیت آنزیمی این ماهی ندارد، بلکه فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز را نیز کاهش می‌دهد که با یافته‌های نتایج حاضر مطابقت ندارد هم‌چنین استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی تجاری از خانواده باسیلوس‌ها در پرورش میگوی سفید هندی *Fenneropenaeus indicus* (Ziaei-Nejad و همکاران، ۲۰۰۶) و *آرتمیا ارومیانا* (Ahmadnia و همکاران، ۲۰۱۱) تأثیری بر فعالیت آنزیم لیپاز نداشته و تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان نداده‌اند. Suzer و همکاران (۲۰۰۸) نیز بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلکالین فسفاتاز، لئوآلاپپتیداز و تریپسین پانکراسی، آمیلاز و لیپاز را از طریق استفاده از سویه‌های لاکتوباسیلوس به‌عنوان پروبیوتیک در لارو ماهی شانک سرطلایی گزارش نمودند. هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در ماهیان سفید تغذیه شده با پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید (Soleimani و همکاران، ۲۰۱۲)، نتایج آزمایش حاضر را که در آن نیز از پربیوتیک الیگوساکارید استفاده شده است را تأیید می‌کند (قاسم‌پور، ۱۳۹۱). سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو را بر میزان فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی ماهی کپورمعمولی مورد بررسی قرار داد و فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره پرورش نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بود که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد اما فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز، آلکالین فسفاتاز و لیپاز در مطالعه قاسم‌پور (۱۳۹۱) در انتهای دوره پرورش اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد که عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت این آنزیم‌ها به‌دلیل ترکیب شیمیایی غذا و کم بودن میزان چربی و کربوهیدرات غذاهای مصرفی و تحریک کم‌تر دستگاه گوارش به تولید آنزیم لیپاز و آلفا آمیلاز دانستند که با مطالعه حاضر مطابقت ندارد و احتمالاً این اختلاف را می‌توان به‌دلیل استفاده از پربیوتیک و پروبیوتیک متفاوت در ترکیب سین‌بیتیک این دو مطالعه دانست. Ye و همکاران (۲۰۱۱) اثر فروکتو و مانان‌الیگوساکارید به تنهای یا همراه با باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را بر فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی در کفشک ماهی ژاپنی مورد بررسی قرار داد که نتایج آن با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به‌عنوان شاخصی مناسب جهت مقایسه ضریب رشد ماهی، پذیرش غذا و هم‌چنین ظرفیت گوارشی، مورد استفاده واقع شود. با توجه به تولید آنزیم‌های گوارشی توسط دستگاه گوارش بچه‌ماهیان کپورمعمولی و هم‌چنین تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های پروبیوتیکی در این آزمایش، نمی‌توان سهم فعالیت آنزیمی ناشی از فعالیت باکتری‌ها و تولید آنزیم توسط بچه ماهیان را تفکیک نمود (Suzer و همکاران، ۲۰۰۸). به‌نظر می‌رسد باکتری‌های *لاکتوباسیلوسی* در غلظت‌های۱ و ۰/۵ درصد ایمنوژن در ترکیب سین‌بیوتیکی مطالعه حاضر به ترتیب باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه دستگاه گوارش بچه‌ماهیان کپورمعمولی شدند که احتمالاً باعث افزایش قابلیت هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش ضریب رشد ویژه خواهند شد. احتمالاً میزان مناسب ایمنوژن باعث عملکرد بهتر *لاکتوباسیلوس کازئی* در ترشح محدوده وسیعی از آنزیم‌های خارجی یا فعالیت آنزیم-های درون‌زاد می‌شوند. Pirarat و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود عنوان نمودند که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک، دارای ریزپرزهای (Villi) طویل‌تری نسبت به گروه شاهد هستند و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و نهایتاً باعث افزایش جذب می‌شود (Caspary، ۱۹۹۲). پروبیوتیک‌ها پس از رسیدن به روده شروع به تکثیر کرده و از پربیوتیک‌ها جهت رشد خود و تولید مواد سازنده اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه استفاده می‌کنند. این اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریزپرزهای روده دارند (Pelicano و همکاران، ۲۰۰۵). اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه به خصوص بوتیریک اسید به‌عنوان اصلی‌ترین منبع انرژی برای سلول‌های اپیتلیال روده محسوب می‌شود. هم‌چنین اسیدبوتیریک می‌تواند باعث آزادسازی پپتیدهای روده‌ای و آنزیم‌های گوارشی شوند که در تکثیر سلول‌های اپیتلیالی موثرند (Blottiere و همکاران، ۲۰۰۷). از نکات جالب توجه در مطالعه حاضر می‌توان به این نکته اشاره کرد که در تیمارهای سین‌بیوتیکی پس از قطع دوره مکمل غذایی (روز ۷۵)، کاهش معنی‌داری در

میزان فعالیت آنزیم‌ها مشاهده نشد و علت را می‌توان افزایش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیکی تحت تأثیر پربیوتیک‌های ایمنوژن دانست. استفاده از سین‌بیوتیک مطالعه حاضر باعث تداوم اثر میکروارگانیسم‌های مفید در دستگاه گوارش می‌شوند که نهایتاً منجر به افزایش فعالیت آنزیم گوارشی در غشای زواید مسواکی دستگاه گوارش، هضم‌پذیری مواد غذایی و در نهایت بهبود کارایی خوراک می‌شود. در پایان باید عنوان نمود کاربرد مکمل غذایی سین‌بیوتیک در بهترین غلظت خود می‌تواند منجر به ایجاد اثرات مفیدی در ماهی میزبان گردد. در مطالعه حاضر تیمار ایمنوژن ١٪ به‌همراه *لاکتوباسیلوس کازئی* به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آلفا آمیلاز، لیپاز، آلکالین فسفاتاز، پروتئاز و تریپسین شد که در نهایت منجر به بهبود هضم و جذب مواد غذایی می‌گردد.

به‌نظر می‌رسد باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* به‌همراه پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان موجود در سین‌بیوتیک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی خواهند شد و احتمالاً همان گونه که از نتایج این آزمایش مشخص است باکتری‌های لاکتیک اسید به‌خصوص *لاکتوباسیلوس کازئی* توانسته‌اند فلور غالبی را در روده کپورماهیان آزمایشی ایجاد کنند و به‌دنبال آن تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر این باکتری‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را به‌وضوح نشان دادند. آن‌چه در کل در آبزی‌پروری حائز اهمیت می‌باشد همین افزایش فعالیت آنزیمی در دستگاه گوارش است که همان گونه که مشاهده گردید این افزایش فعالیت احتمالاً باعث افزایش فاکتورهای رشد بچه‌ماهیان خواهد گردید.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از همکاری مجدانه جناب آقای مهندس علی محمدیان کارشناس‌ارشد مؤسسه سرم‌سازی رازی که در اجرای این تحقیق یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

١. **محرابی، ز.ف.؛ فریدبخش، م.؛ حیدری، ع. و جعفرپور، م.، ١٣٨٩.** بررسی اثر مکمل غذایی سین‌بیوتیک بر پروتئین‌های سرم خون بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان. چهارمین کنگره علوم دامی ایران. دانشگاه تهران.

٢. **جافرنوده، ع.؛ سوداگر، م.؛ اصلان‌پرویز، ح. و حیدری، م.، ١٣٨٩.** بررسی اثر پربیوتیک ایمونوژن بر شاخص‌های رشد بچه ماهیان قره‌برون *Acipenser persicus* اولین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فراویژه. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز.

٣. **قاسم‌پوردهقانی، پ.، ١٣٩١.** بررسی اثر سطوح مختلف سین‌بیوتیک Biomin IMBO برفعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی، پارامترهای رشد و فلور میکروبی ماهی کپورمعمولی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ٨٠ صفحه.

٤. **Ahmadnia, H.R.; Farhangi, M.; Rafiee, G.H.; Noori, F. and Safari, O., ٢٠١١.** Effects of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on digestive enzyme activities in *Artemia urmiana*. ASIA-PAC quaculture. India. pp: ١٧-٢٠.

٥. **Bairagi, A.; Ghosh, K.S.; Sen, S.K. and Ray, A.K., ٢٠٠٢.** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquacul International. Vol. ١٠, pp: ١٠٩-١٢١.

٦. **Balcázar, J.L.; Blas, I.; Ruiz Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D. and Muzquiz, J.L., ٢٠٠٦.** The role of the probiotics in aquaculture. Veterinary Microbioogy. Vol. ١١٤, pp: ١٧٣-١٨٦.

٧. **Bezerra, R.S.; Lins, E.J.F.; Alencar, R.B.; Paiva, P.M.G; Chaves, M.E.C.; Coelho, L.C.B.B. and Carvalho-Jr, L.B., ٢٠٠٥.** Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry. Vol. ٤٠, pp: ١٨٢٩-١٨٣٤.

٨. **Blottiere, H.M.; Buecher, B.; Galmiche, J.P. and Cherbut, C., ٢٠٠٧.** Molecular analysis of the effect of short chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceedings of the Nutrition Society. Vol. ٦٢, pp: ١٠١-١٠٦.

٩. **Burr, B.; Hume, M. and Gatlin, D., ٢٠٠٨.** Effects of GroBiotic-A, inulin, mannan oligosaccharide and galactooligosaccharide on the growth and intestinal microbial communities of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass Morone chrysops x M. saxatilis. Aquaculture America.

١٠. **Caspary, W.F., ١٩٩٢.** Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. Am J Clin Nutr. Vol. ٥٥, No.١, pp: ٢٩٩-٣٠٨.

١١. **Cahu, C.L.; Zambonino-Infante, J.L.; Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., ١٩٩٩.** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for ١٠-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. Vol. ١٧١, pp: ١٠٩-١١٩.

١٢. **Chan, C.R.; Lee, D.N.; Cheng, Y.H.; Hsieh, D.J.Y. and Weng, C.F., ٢٠٠٨.** Feed deprivation and refeeding on alterations of proteases in Tilapia *Oreochromis mossambicus*. Zoological Studies. Vol. ٤٧, pp: ٢٠٧-٢١٤.

١٣. **Chang, A.S.C.; Hashim, R.; Chow-Yang, L. and Ali, A.B., ٢٠٠٢.** Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish, *Symphysodon aeguifasciata*. Aquaculture. Vol. ٢٠٣, pp: ٣٢١-٣٣٣.

١٤. **Das, K.M. and Tripathi, S.D., ١٩٩١.** Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Aquaculture. Vol. ٩٢, pp: ٢١-٣٢.

١٥. **Ebrahimi, G.H.; Ouraji, H.; Khalesi, M.K.; Sudagar, M.; Barari, A.; Zarei Dangesaraki, M. and Jani Khalili, K.H., ٢٠١١.** Effects of a prebiotic, Immunogen_, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to Aeromonas hydrophila infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. ٤٣٢, pp: ١-٩.

١٦. **FAO/WHO. ٢٠١٤.** Evaluation of health and nutritonal properites of probiotics in food including powder milk Live

lactic acid beacteria, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. FAO, Cordoba. Argentina.

۱۷. **Hidalgo, M.C.; Urea, E. and Sanz, A., ۱۹۹۹**. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits.Proteolitic and amylase activities. Aquaculture. Vol. ۱۷۰, pp: ۲۶۷-۲۸۳.

۱۸. **Kuz'mina, V.V. and Skvortsova, E.G., ۲۰۰۱.** Activity of proteolytic enzymes of potential prey of predatory fish influence of natural and anthropogenic factors. Journal of Ichthyology. Vol. ۴۱, No. ۳, pp: ۲۴۶-۲۵۴.

۱۹. **Jun-sheng, L.; Jian-lin, L. and Tingting, W., ۲۰۰۶.** Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) Fish Physiology and Biocccchemistry. Vol. ۳۲, pp: ۲۹۵-۳۰۳.

۲۰. **Kawai, S. and Ikeda, S., ۱۹۷۲**. Studies on digestive enzymes of fishes.II Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. Bulletin of the Japanese Society of the Scientific Fisheries. Vol. ۳۸, pp: ۲۶۵-۲۷۰.

۲۱. **Ksarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J. and Gibson, L., ۲۰۰۸**. Probiotics in aquaculture the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. Vol. ۲۷۴, pp: ۱-۱۴.

۲۲. **Lemieux, H.; Blier, P. and Dutil, J.D., ۱۹۹۹.** Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۲۰, pp: ۲۹۳-۳۰۳.

۲۳. **Millette, M.; Luquet, F.M. and Lacroix, M., ۲۰۰۷.** In vitro growth of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. Letters in Applied Microbiology. Vol. ۴۴, pp: ۳۱۴-۳۱۹.

۲۴. **Pelicano, E.R.L.; Souza, P.A.; Souza, H.B.A.; Figueiredo, D.F.; Boiago, M.M.; Carvalho, S.R. and Bordon, V.F., ۲۰۰۵.** Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. Revista Brasileira de Ciencia Accola. Vol. ۷, pp: ۲۲۱-۲۲۹.

۲۵. **Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Endo, M.; Katagiri, T.; Ponpornpisit, A.; Chansue, N. and Maita, M., ۲۰۱۱.** Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG.Research in Veterinary Science. Vol. ۹۱, pp: ۹۲-۹۷.

۲۶. **Rungruangsak-Torrissen, K.; Rustad, A.; Sunde, J.; Eiane, S.A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J.; Nygard, E.; Samuelsen, T.A.; Mundheim, H. and Luzzana, U., ۲۰۰۲**. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. J Sci Food Agr. Vol. ۸۲, pp: ۶۴۴-۶۵۴.

۲۷. **Salze, G.; McLean, E.; Schwarz, M.H. and Craig, S.R., ۲۰۰۸.** Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture. Vol. ۲۷۴, pp: ۱۴۸-۱۵۲.

۲۸. **Skrodenyte-Arbaciauskiene, V.; Sruoga, A.; Butkauskas, D. and krupskelis, K., ۲۰۰۸.** Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo truttatrutta* and diet. Fisheries Science. Vol. ۷۴, pp: ۱۳۰۷-۱۳۱۴.

۲۹. **Soleimani, N.; Hoseinifar, S.H.; Merrifield, D.L.; Barati, M. and Hassan Abadi, Z., ۲۰۱۲.** Dietary supplementation of fructo oligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growthper formance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish and shellfish immunology.

۳۰. **Staykov, Y.; Spring, P.; Denev, S. and Sweetman, J., ۲۰۰۷.** Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult Int. Vol. ۱۵, pp: ۱۵۳-۱۶۱.

۳۱. **Sun, Y.Z.; Yang, H.L.; Ma, R.L.; Song, K. and Li, J.S., ۲۰۱۱.** Effect of *Lactococcuslactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture Nutrition. Vol. ۱۸, No. ۳, pp: ۲۸۱-۲۸۹.

۳۲. **Sunde, J.; Taranger, G. and Rungruangsak-Torrissen, K., ۲۰۰۱**. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۲۵, pp: ۳۳۵-۳۴۵.

۳۳. **Suzer, C.; Coban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuoglu, O. and Kucuksari, H., ۲۰۰۸**. *Lactobacillus spp*. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata, L.*) larvae: Effects on growth. Aquaculture. Vol. ۲۸۰, pp: ۱۴۰-۱۴۵.

۳۴. **Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Robaina, L.; Real, F.; Sweetman, J.; Tort, L. and Izquierdo, M.S., ۲۰۰۷**. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Journal of Fish & Shellfish Immun. Vol. ۲۳, pp: ۹۶۹-۹۸۱.

۳۵. **Tovar-Ramírez, D.; Zambonino, J.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; Vázquez-Juárez, R. and Lésel, R., ۲۰۰۲.** Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. ۲۰۴, pp: ۱۱۳-۱۲۳.

۳۶. **Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., ۲۰۰۰.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculcure. Microbiol. Mol. Boil. Rev. Vol. ۶۴, pp: ۶۵۵-۶۷۱.

۳۷. **Wang, Y.B. and Xu, Z., ۲۰۰۶**. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology. Vol. ۱۲۷, pp: ۲۸۳-۲۹۲.

۳۸. **Wang, Y.B., ۲۰۰۷**. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. ۲۶۹, pp: ۲۵۹-۲۶۴.

۳۹. **Welker, T.L.; Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M.; Shelby, R. and Klesius, P.H., ۲۰۰۷.** Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri*, fed diets containing commercial whole cell yeast or yeast subcomponents. J World Aquacult Soc. Vol. ۳۸, No. ۱, pp: ۲۴-۳۵.

۴۰. **Worthington, C.C., ۱۹۹۱.** Manual related Biochemical. ۳th Edition. Freehold, New Jerse. pp: ۸۰-۸۵.

۴۱. **Ye, J.D.; Wang, K.; Li, F.D. and Sun, Y.Z., ۲۰۱۱**. 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*. Aquac Nutr. Vol. ۱۷, pp: ۹۰۲-۹۱۱.

۴۲. **Ziaei-Nejad, S.; Rezaei, M.H.; Takami, G.A.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M., ۲۰۰۶**. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in theIndian (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture. Vol. ۲۵۲, pp: ۵۱۶-۵۲۴.