

## تأثیر استفاده از لاکتوفرین و *Lactobacillus rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ در جیره غذایی بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و بافت روده و تخمدان ماهی مولد ماده کاراس طلایی (*Carassius auratus*)

- حمیدرضا احمدنیای مطلق\*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
  - عبدالمجید حاجی مرادلو: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
  - رسول قربانی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
  - ناصر آق: گروه شیلات، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵
- تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۵      تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۵

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر استفاده از لاکتوفرین و *Lactobacillus rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ به مدت ۱۲۰ روز بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک مولدین ماده کاراس طلایی (*Carassius auratus*) (میانگین وزن ۱۲/۲۱±۰/۵۰ گرم) طراحی شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار اول: باکتری *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ (۱۰<sup>۶</sup> باکتری در گرم جیره)، تیمار دوم: لاکتوفرین (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره)، تیمار سوم: تیمار ترکیبی *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ (۱۰<sup>۶</sup> باکتری در گرم جیره) به همراه لاکتوفرین (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) و شاهد (جیره غذایی بدون افزودنی) در سه تکرار بود. نتایج نشان داد شاخص‌های کبدی (۶/۰۵±۱/۰۲) و روده‌ای (۶/۹۷±۱/۰۷) به صورت معنی‌داری در تیمار یک افزایش یافت ( $p < ۰/۰۵$ ). بالاترین درصد شاخص گنادی (۱۹/۵۸±۰/۸۲) در تیمار یک به دست آمد ( $p < ۰/۰۵$ ) مطالعات بافت‌شناسی روده نشان داد طول (۳۳۰ میکرومتر)، عرض (۱۰۹ میکرومتر) و مساحت (۱۱۲۹۴۶ میکرومتر مربع) سطح جذبی پرزهای روده در تیمار یک بیش‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی بود ( $p < ۰/۰۵$ ). در پایان دوره آزمایش، تخمدان ماهیان شاهد، تیمار اول و دوم در مرحله V رسیدگی جنسی قرار داشتند در حالی که تیمار سوم در ابتدای مرحله IV جنسی قرار داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ به دلیل افزایش سطح جذبی پرزهای روده، می‌تواند گزینه مناسبی جهت افزایش بهره‌وری غذایی در ماهی کاراس طلایی باشد.

**کلمات کلیدی:** کاراس طلایی، *Lactobacillus rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷، لاکتوفرین، شاخص‌های فیزیولوژیک



## مقدمه

سلول‌های مذکور می‌شود. این مولکول‌های تولیدی وارد جریان خون شده و گلبول‌های سفید در حال گردش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و یا ممکن است به‌صورت مستقیم موجب تحریک گلبول‌های سفید در بافت‌های لنفوئیدی مذکور شوند (Rahimnejad و همکاران، ۲۰۱۲؛ Tomita و همکاران، ۲۰۰۹).

در حالی که مطالعات متعددی به بررسی اثر پروبیوتیک‌های مختلف بر شاخص‌های فیزیولوژیک آبزبان مانند شاخص‌های گنادی (Carnevali و همکاران، ۲۰۱۳)، روده‌ای (Ramos و همکاران، ۲۰۱۶؛ Topic و همکاران، ۲۰۱۶؛ Zhang و همکاران، ۲۰۱۵) و کبدی (Garg و همکاران، ۲۰۱۵؛ López و همکاران، ۲۰۱۴) پرداخته‌اند، اطلاعاتی پیرامون نحوه اثر لاکتوفرین یا ترکیب لاکتوفرین و پروبیوتیک، بر بافت کبد، روده و گناد آبزبان یافت نشد. آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر استفاده از لاکتوفرین و باکتری ۱۶۳۷ PTCC *L. rhamnosus* بر شاخص‌های کبدی، روده‌ای، گنادی و هم‌چنین بر اندازه و تغییرات بافتی تخمدان، کبد و روده مولدین ماده کاراس طلایی (*Carassius auratus*) طراحی شد.

## مواد و روش‌ها

**طراحی آزمایش:** این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (۳ تیمار آزمایشی به همراه یک تیمار شاهد و هر یک در ۳ تکرار) اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار ۱: (*Lactobacillus rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ (۱۰<sup>۶</sup> باکتری در هر گرم غذا)، تیمار ۲: (۲۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا)، تیمار ۳: ترکیب (*L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ (۱۰<sup>۶</sup> باکتری در هر گرم غذا به علاوه لاکتوفرین ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا) و یک تیمار شاهد (بدون افزودنی غذایی) بودند.

**باکتری‌ها و لاکتوفرین مورد استفاده:** باکتری‌های مورد استفاده در این طرح به شکل لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و برای مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS Broth (آلمان، Merck®) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. جهت تعیین میزان تراکم باکتری، از روش تراکم سنجی نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر از اسپکتروفتومتر، استفاده شد. لاکتوفرین محصول شرکت (بلژیک Biopole S.A®) پس از خریداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شد.

**اجرای آزمایش:** جهت آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی، لاکتوفرین و ۱۶۳۷ PTCC *L. rhamnosus* با سطوح ذکر شده در آب مقطر استریل حل و به‌صورت کاملاً همگن بر سطح غذای اسپری شد. به‌منظور افزایش چسبندگی باکتری و لاکتوفرین از ژلاتین

امروزه با توجه به اهمیت غذاهای دریایی در سلامت بشر و افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف آن، لزوم پیشبرد مطالعات به سمت ارائه راه‌کارهای عملی جهت بهره‌برداری حداکثری از منابع و امکانات موجود، بیش از پیش نمایان می‌گردد. به‌منظور دستیابی به حداکثر بازدهی در صنعت آبی‌پروری، تأمین بهینه مواد مغذی ضروری است. امروزه علاوه بر مواد مغذی اصلی، استفاده از محرک‌های رشد در صنعت آبی‌پروری بسیار مورد توجه است، استفاده از مکمل‌های غذایی میکروبی و به‌ویژه پروبیوتیک‌ها در طی دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده و تحقیقات گسترده‌ای در این خصوص صورت پذیرفته است (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). این تحقیقات عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات بر شاخص‌های رشد (Motlagh و همکاران، ۲۰۱۲)، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵) بوده است.

جنس لاکتوباسیل از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین پروبیوتیک‌های آبزبان می‌باشد که بیش از ۵۰ گونه را شامل می‌شود (Tannock، ۲۰۰۴). این باکتری‌ها، تعداد زیادی مواد با قابلیت اثرگذاری بر سطح و درون سلول تولید و ترشح می‌کنند (Lebeer و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات ترانسکریپتومیک (transcriptomic) و پروتئومیک (proteomic) نشان داده است که تعداد زیادی از نوپروتئین‌های (neoproteins) ترشح شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها، میزبان را در سطوح مختلفی از قبیل مهار عوامل بیماری‌زای روده‌ای، سلامت مخاط دستگاه گوارش، سیستم ایمنی، سوخت‌وساز بدن، رشد سلولی و تولیدمثل تحت تأثیر قرار می‌دهد (Carnevali و همکاران، ۲۰۱۳).

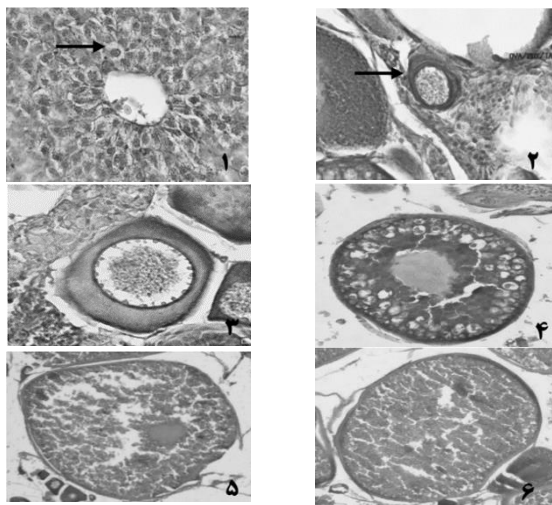
علاوه بر پروبیوتیک‌ها سایر افزودنی‌های خوراکی طبیعی، مانند لاکتوفرین مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rodríguez و همکاران، ۲۰۱۲). لاکتوفرین یکی از گلیکوپروتئین‌های موجود در شیر می‌باشد که در سایر ترشحات مخاطی پستانداران نیز یافت می‌شود (González و همکاران، ۲۰۰۹). لاکتوفرین یکی از مؤلفه‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی بوده و نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به آن نسبت داده شده است که از آن جمله می‌توان به تنظیم عملکرد ایمنی (Esteban و همکاران، ۲۰۰۵)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Takayama و همکاران، ۲۰۱۱)، تنظیم جذب آهن و رشد و تکثیر ماکروفاژها، تنظیم تولید رادیکال هیدروکسیل به‌وسیله ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها (سلطانی، ۱۳۸۷) اشاره کرد. مطالعات نشان داده است که لاکتوفرین خوراکی در جانوران روی سلول‌های اپی‌تلیال روده و بافت‌های لنفوئیدی مرتبط با روده عمل کرده و موجب افزایش تولید اینترلوکین ۱۸ و دیگر سایتوکین‌ها توسط

فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. رنگ آمیزی بافت‌ها به روش هماتوکسیلین ائوزین و طبق دستورالعمل Khodabandeh و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت. عکس برداری از بافت توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال صورت گرفت. جهت تجزیه و تحلیل عکس‌های تهیه شده و اندازه‌گیری طول، عرض و مساحت سطح جذبی پرزهای روده از نرم افزار Image J ۱۵۰ استفاده شد. مساحت سطح جذبی پرزهای روده بر اساس فرمول زیر به دست آمد.  $\pi$  معادل ۳/۱۴ در نظر گرفته شد.

مساحت سطح جذبی پرزهای روده (میکرومتر مربع)

$$\pi \times (\text{عرض پرز (میکرومتر)} \times \text{طول پرز (میکرومتر)}) =$$

**بررسی روند رسیدگی جنسی در طول دوره پرورش:** لام‌های بافت‌شناسی تخمدان به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین مورد مطالعه قرار گرفتند. تأیید مراحل مختلف رسیدگی جنسی طبق دستورالعمل ارائه شده توسط (McMillan, ۲۰۰۷) صورت گرفت (شکل ۱). تشخیص مراحل رسیدگی تخمدان با استفاده از شمارش حداقل ۱۰۰ اووسیت و برحسب قرار گرفتن اکثر اووسیت‌ها در مراحل تعریف شده صورت گرفت.



شکل ۱: مراحل مختلف رسیدگی جنسی در تخمدان مولدین

#### ماده کاراس طلائی در انتهای دوره پرورش

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ۱- اووگونی‌های تولید شده توسط لایه زاینده در تخمدان ماهی کاراس طلائی. تخمدان در مرحله رسیدگی جنسی I. بزرگ نمایی  $\times 200$ . ۲- سلول‌های اووگونی‌ای رشد یافته. انتهای مرحله I. بزرگ نمایی  $\times 200$ . ۳- اووسیت در مرحله II رسیدگی جنسی. هستک‌ها در مجاورت دیواره داخلی غشاء هسته قابل تشخیص می‌باشند. بزرگ نمایی  $\times 200$ . ۴- اووسیت در مرحله III رسیدگی جنسی و پیش زرده‌سازی به همراه ویزیکول‌های متعدد زرده. بزرگ نمایی  $\times 200$ . ۵- اووسیت در مرحله IV رسیدگی جنسی. زرده‌سازی پیشرفته در حال انجام و هسته در حال مهاجرت به قطب حیوانی. سیتوپلاسم حاوی گرانول‌های زرده می‌باشد. در این مرحله زرده کاملاً رنگ ائوزینوفیلی دارد. ۶- مرحله V رسیدگی جنسی هسته کاملاً ناپدید شده و تخمک آماده اوولاسیون و لقاح می‌باشد.

به مقدار ۴ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا استفاده شد. غذای گروه شاهد بدون اضافه کردن لاکتوفرین و باکتری، تنها با اضافه کردن ژلاتین به دست آمد. جیره‌های آماده شده پس از خشک شدن در دمای اتاق، به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و تا زمان استفاده نگهداری شدند. با انجام کشت‌های باکتریایی در فواصل زمانی معین، از زنده ماندن باکتری‌های منتقل شده به غذا اطمینان حاصل شد.

جهت اجرای آزمایش، ۲۲۵ قطعه بچه ماهی *Carassius auratus* ظاهراً سالم، هم‌اندازه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی جهاد دانشگاهی استان مازندران، خریداری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و طی کردن مراحل سازگاری، به صورت تصادفی بین تیمارهای آزمایشی تقسیم شدند تغذیه به میزان ۲/۵ درصد وزن بدن و سه بار در روز به مدت ۱۲۰ روز با جیره مخصوص ماهیان زینتی (Energy®) انجام شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب نظیر دما، مقدار اکسیژن محلول و pH منطبق بر شرایط استاندارد پرورشی (Lorenzoni و همکاران، ۲۰۰۷) تنظیم شد. منبع آب مورد استفاده برای پرورش، از آب لوله‌کشی شهری پس از حذف کلر تأمین و در طول دوره پرورش بچه ماهیان از نظر ظاهری و نحوه حرکت و رفتارهای تغذیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. تعویض روزانه آب به میزان یک سوم حجم آب مخازن پرورشی بود.

#### اندازه‌گیری شاخص‌های مورد مطالعه: نمونه برداری به منظور

برآورد وزن کل تخمدان، کبد و روده مولدین ماده، در پایان آزمایش با بی‌هوش کردن ماهی توسط پودر گل‌میخک (۵ گرم در لیتر) و شکافتن بدن از بالای منفذ تناسلی تا حدفاصل سرپوش آبششی در ناحیه شکمی و خارج سازی تخمدان، کبد و روده و وزن کردن آن‌ها صورت گرفت. شاخص‌های فیزیولوژیک شامل شاخص‌های گنادی، کبدی و روده‌ای براساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند. لازم به ذکر است که معیار تمامی وزن‌ها براساس گرم می‌باشد.

۱۰۰/(وزن بدن/وزن گناد) = شاخص گنادی (درصد)

۱۰۰/(وزن بدن/وزن کبد) = شاخص کبدی (درصد)

۱۰۰/(وزن بدن/وزن روده) = شاخص روده‌ای (درصد)

#### بافت‌شناسی تخمدان، بیضه، روده و کبد: به منظور بررسی

اثرات تیمارهای مختلف بر هیستومورفولوژی تخمدان و روده ماهیان مولد کاراس طلائی، در ابتدا، میانه (پس از گذشت ۳۰ روز از غذادهی) و پایان دوره آزمایش، پس از یک روز قطع غذادهی، از هر تیمار ۳ ماهی به طور تصادفی انتخاب گردید. پس از بی‌هوشی ماهیان بافت‌های تخمدان و روده آن‌ها با دقت خارج گردید. نمونه‌های بافت تخمدان جهت مطالعات بافت‌شناسی در محلول بوئن و بافت‌های روده در



**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** بعد از آزمون نرمال بودن و همگن بودن داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه میانگین بین تیمارها و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها (در سطح اعتماد ۵ درصد) با نرم‌افزار آماری SPSS ۱۷ تحت ویندوز استفاده شد.

## نتایج

شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی: میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی در پایان دوره آزمایش در

جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج، تیمار شاهد کم‌ترین و تیمار یک، بیش‌ترین میزان شاخص کبدی را داشتند ( $p < 0/05$ ). شاخص روده‌ای در تیمار یک بالاترین مقدار را نشان داد و از این نظر با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. براساس نتایج به‌دست آمده، بیش‌ترین ( $19/58 \pm 1/82$ ) و کم‌ترین ( $6/82 \pm 0/69$ ) شاخص گنادی به ترتیب در تیمارهای یک و سه مشاهده شد. شاخص گنادی بین تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ).

جدول ۱: میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی ماهیان مولد ماده کاراس طلایی تغذیه شده با لاکتوفیرین و

*L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ در تیمارهای آزمایشی در پایان دوره آزمایش ( $n=3$ )

تیمار	شاخص کبدی (%)	شاخص روده‌ای (%)	شاخص گنادی (%)
شاهد	$4/34 \pm 0/82^a$	$5/01 \pm 0/65^a$	$16/84 \pm 2/92^b$
تیمار اول	$6/05 \pm 1/02^b$	$6/97 \pm 1/07^b$	$19/58 \pm 0/82^b$
تیمار دوم	$4/54 \pm 0/21^{ab}$	$6/33 \pm 0/55^{ab}$	$19/51 \pm 4/85^b$
تیمار سوم	$4/54 \pm 1/18^{ab}$	$4/96 \pm 0/05^a$	$6/82 \pm 0/69^a$

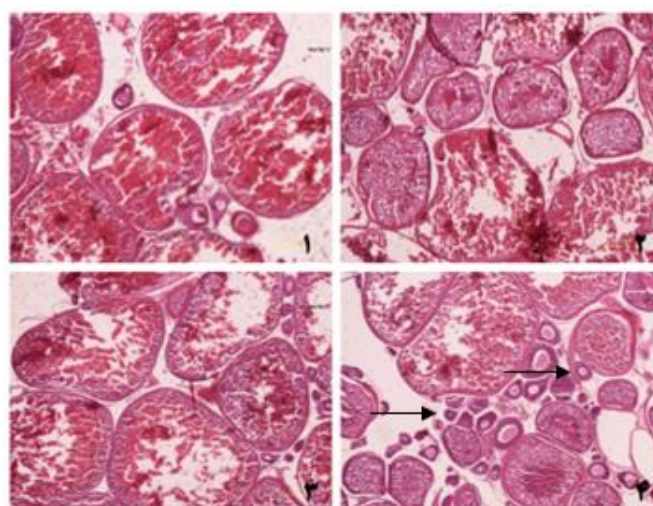
\* داده‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0/05$ ).

### بافت‌شناسی روده: تأثیر استفاده از لاکتوفیرین و *L. rhamnosus*

PTCC ۱۶۳۷ در جیره غذایی مولدین ماهی کاراس طلایی بر طول پرزهای روده نشان داد که بلندترین پرزهای روده (۳۳۰ میکرومتر) مربوط به تیمار اول و کوتاه‌ترین (۲۲۱ میکرومتر) آن‌ها مربوط به تیمار دوم می‌باشد ( $p < 0/05$ ) (شکل ۳).

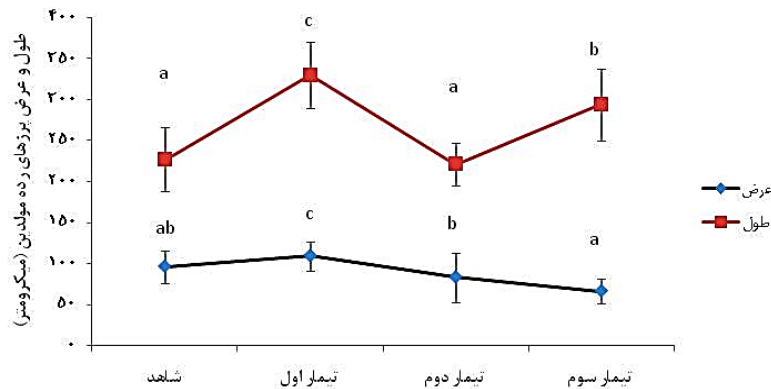
### بافت‌شناسی تخمدان: نتایج به‌دست آمده نشان داد (شکل ۲)

که در پایان آزمایش و قبل از آغاز عملیات تخم‌کشی، مولدین شاهد و تیمارهای اول و دوم در مرحله V رسیدگی جنسی قرار داشتند در حالی که مولدین تیمار سوم در انتهای مرحله III و آغاز مرحله IV قرار داشتند.

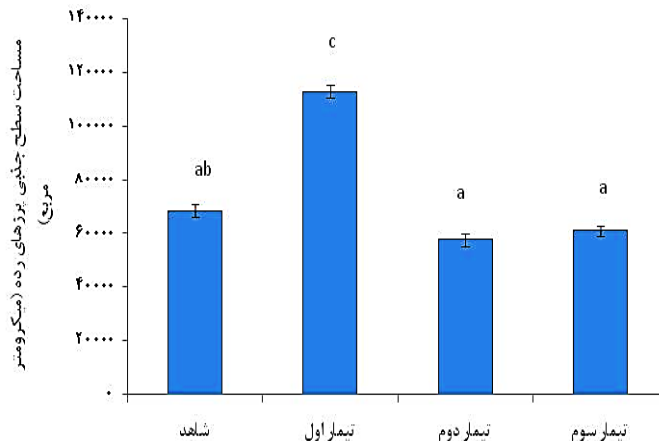


شکل ۲: بافت تخمدان در انتهای دوره آزمایش بزرگ‌نمایی  $4 \times$  رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (۱) تیمار دوم (۲) تیمار شاهد (۳) تیمار اول (۴) تیمار سوم. تخمک‌های نارس در تیمار سوم با فلش نشان داده شده‌اند.

همچنین طول پرزهای روده در تیمار شاهد نیز اختلاف معنی داری با تیمار اول نشان داد ( $p < 0.05$ ). تیمار شاهد با تیمار سوم اختلاف معنی داری نداشت. داده‌های مربوط به عرض پرزهای روده (شکل ۳) نشان داد که بیش‌ترین عرض پرزهای روده (۱۰۹ میکرومتر) مربوط به تیمار اول و کم‌ترین (۶۶ میکرومتر) آن مربوط به تیمار سوم می‌باشد ( $p < 0.05$ ). تیمار شاهد تنها با تیمار اول اختلاف معنی دار نشان داد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۳: نمودار میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) طول و عرض پرزهای روده در مولدین کاراس طلائی تغذیه شده با لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ در تیمارهای مختلف (n=۳)



شکل ۴: نمودار میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) مساحت سطح جذبی پرزهای روده در مولدین کاراس طلائی تغذیه شده با لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ در تیمارهای مختلف (n=۳)

لاکتوفرین نسبت به تیمار ترکیبی و شاهد قابل مشاهده بود. ارتقای شاخص گنادی در ۴ گونه از ماهیان زنده‌زای گوپی (*Poecilia reticulata*، مولی (*Poecilia sphenops*), دم شمشیری سبز (*Xiphophorus helleri*) و پلاتی (*Xiphophorus maculatus*) (Xiphophorus Ghosh) و همکاران، ۲۰۰۷) و هم‌چنین در ماهی *Fundulus heteroclitus* (Lombardo و همکاران، ۲۰۱۱) که به ترتیب با باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ تیمار شده بودند نیز گزارش شده است. هم‌چنین نتایج نشان داد که تیمارهای دریافت‌کننده لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ در پایان آزمایش در مرحله جنسی V قرار داشته درحالی‌که تیمار ترکیبی در مرحله III و آغاز مرحله IV قرار داشتند. احتمالاً لاکتوفرین با اعمال محدودیت رشد

هم‌چنین نتایج مساحت سطح جذبی پرزهای روده نشان داد که بیش‌ترین مساحت سطح جذبی (۱۱۲۹۴۶ میکرومتر مربع) مربوط به تیمار اول و کم‌ترین (۵۷۵۹۷ میکرومتر مربع) آن مربوط به تیمار سوم می‌باشد (شکل ۴). تیمار شاهد تنها با تیمار اول اختلاف معنی دار نشان داد ( $p < 0.05$ ).

## بحث

شاخص گنادی ابزار مناسبی برای نظارت بر پیشرفت گامتوژنز در ماهیان استخوانی می‌باشد (Guerrero و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش شاخص گنادی در تیمار دریافت‌کننده *L. rhamnosus* PTCC ۱۶۳۷ و

دهنده پرز روده بوده و می‌تواند سبب تحریک ترشح پروتئین‌های دستگاه گوارش یا عوامل رشدی شود که بر تکثیر سلول‌های پرز روده مؤثر باشند (Blottière و همکاران، ۲۰۰۳)؛ بنابراین ممکن است افزایش وزن روده در ماهیان مولد تیمار شده با پروبیوتیک را تا حدی به بیش‌تر شدن طول، عرض و حجم پرزهای روده مربوط دانست.

دلایل کاهش طول، عرض و مساحت سطح جذبی پرزهای روده در تیمارهای دوم و سوم کاملاً مشخص نیست. احتمالاً متابولیت‌های ناشناخته حاصل از برهم‌کنش لاکتوفرین و اجزای تشکیل‌دهنده جیره (Yokoyama و همکاران، ۲۰۰۶) در عدم تکثیر بهینه سلول‌های موجود در پرزهای روده دخیل می‌باشند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که لاکتوفرین حاصل از عمل پپسین بر لاکتوفرین در دستگاه گوارش دارای خواص ضدباکتریایی شدیدتری نسبت به لاکتوفرین می‌باشد (Takayama و همکاران، ۲۰۱۲)؛ بنابراین ممکن است با تولید لاکتوفرین در دستگاه گوارش فعالیت باکتری‌های مفید و رشد پرزهای روده تحت تأثیر قرار گرفته باشد.

علی‌رغم وجود خاصیت بازدارندگی یا محدودکنندگی لاکتوفرین بر ضد باکتری‌های پروبیوتیک (Tian و همکاران، ۲۰۱۰؛ Sherman و همکاران، ۲۰۰۴) شاخص‌های روده‌ای گنادی و کبدی در تیمار ترکیبی به‌صورت قابل ملاحظه‌ای از همه تیمارها پائین‌تر بود. پژوهش‌های مشابه در ارتباط با به‌کارگیری ترکیب پروبیوتیک و لاکتوفرین در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Ownagh و همکاران، ۲۰۱۳)، کاهش رشد را تأیید می‌کند. محققین دلیل این اتفاق را به ترکیبات ناشناخته موجود در جیره و اثرات متقابل آن‌ها با لاکتوفرین و متابولیت‌های باکتریایی، اختصاصات سیستم گوارشی و شرایط پرورش نسبت می‌دهند (Yokoyama و همکاران، ۲۰۰۶). با توجه به این‌که ترکیب باکتری ۱۶۳۷ PTCC *L. rhamnosus* و لاکتوفرین به نوعی بازدارندگی رشد غدد جنسی را به‌همراه داشت، استفاده از این ترکیب جهت کنترل و ایجاد تأخیر در تولیدمثل پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده، استفاده از *L. rhamnosus* ۱۶۳۷ PTCC به‌دلیل افزایش سطح جذبی پرزهای روده، می‌تواند گزینه مناسبی جهت افزایش بهره‌وری غذایی و لاکتوفرین به‌دلیل بهبود شاخص گنادی، در ارتقاء تکثیر این گونه مؤثر واقع شود.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مجموعه گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، جناب آقای مرتضی قاسمی و دکتر علی جعفر جهت در اختیار قرار دادن امکانات و همکاری در انجام مراحل عملی آزمایش حاضر، کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

علیه باکتری‌های بیماری‌زا یا خنثی روده می‌تواند شرایط رشد بهتری را برای باکتری‌های مفید دستگاه گوارش از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک مهیا کند. لذا فعالیت این باکتری‌های مفید میزان بیش‌تری از ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب ضروری را در اختیار میزبان قرار داده (Ghosh و همکاران، ۲۰۰۷) و در نتیجه باعث توسعه و تکامل مناسب تخمدان شده باشند.

شاخص کبدی به‌عنوان شاخصی از سلامتی و متابولیسم ماهی مطرح می‌باشد (Krogdahl و همکاران، ۲۰۰۴). شاخص کبدی در ماهیان ماده تیمار شده با ۱۶۳۷ PTCC *L. rhamnosus* نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. طی مطالعه‌ای که در آن از جیره‌های حاوی نسبت‌های مختلف نشاسته به چربی به همراه باکتری *Bacillus subtilis* در تغذیه ماهی سی‌باس سفید (*Atractoscion nobilis*) استفاده شده بود مشخص شد که این باکتری دارای قابلیت افزایش شاخص کبدی می‌باشد (López و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین در تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) تیمار شده با مخلوط پروبیوتیکی SPILAC شاخص کبدی افزایش یافت (Garg، ۲۰۱۵). کبد ماهی ماده محتوی سطح بالایی از گیرنده‌های استروژنی است که اجازه تولید ویتلوژنین و پروتئین‌های پوشش زرده را به‌دنبال تحریک استروژنی می‌دهد. این گیرنده‌ها در کبد ماهیان نر و ماده‌های نابالغ نیز وجود دارد که به‌علت عدم تحریک غیرفعال می‌باشند (Spanò و همکاران، ۲۰۰۴). لذا، با توجه به داده‌های بافت‌شناسی تخمدان و افزایش ذخیره زرده اووسیت‌ها در مراحل پایانی رشد جنسی، به‌نظر می‌رسد به‌علت شدت گرفتن ویتلوژنز و لیپوژنز در کبد (مشکوه روحانی و همکاران، ۱۳۸۶)، این اندام فعال‌تر و بزرگ‌تر شده باشد.

شاخص روده‌ای یکی از مؤلفه‌های کیفیت تغذیه در آبزیان می‌باشد. در آزمایش حاضر، تیمار سوم کم‌ترین و تیمار اول بیش‌ترین شاخص روده‌ای در ماهیان مولد ماده کاراس طلایی نشان دادند. نتایج حاصل از بافت‌شناسی روده نشان داد که تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک از طول، عرض و در نتیجه مساحت سطح جذبی بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند. نتایج مشابهی در ارتباط با افزایش طول پرزهای روده در اثر افزودن باکتری *L. rhamnosus* ۱۶۳۷ PTCC در جیره غذایی ماهی تیلاپپای نیل مشاهده شد (Pirarat و همکاران، ۲۰۱۱ و ۲۰۱۵). مکانیسم احتمالی درگیر در توسعه پرزهای روده در تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک، کلنی‌سازی پروبیوتیک‌ها در روده و استفاده از قند موجود در جیره به‌عنوان منبع انرژی و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مانند بوتیریک اسید می‌باشد. اسیدهای چرب زنجیره کوتاه می‌توانند نقش زیادی در افزایش رشد طولی پرزهای روده داشته باشند. اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مخصوصاً بوتیریک اسید منبع اصلی انرژی سلول‌های تشکیل

## منابع

- action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. ۷۲, pp: ۷۲۸-۷۶۴.
۱۴. López, L.M.; Olmos, J.; Trejo, Escamilla, I.; Flores, Ibarra, M.; Ochoa, L.; Drawbridge, M. and Peres, H., ۲۰۱۴. Evaluation of carbohydrate-to-lipid ratio in diets supplemented with *Bacillus subtilis* probiotic strain on growth performance, body composition and digestibility in juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*, Ayres ۱۸۶۰). *Aquaculture Research*. Vol. ۵۶, pp: ۱۱۲۰-۱۱۳۶.
  ۱۵. Lorenzoni, M., Corboli, M.; Ghetti, L.; Pedicillo, G. and Carosi, A., ۲۰۰۷. Growth and reproduction of the goldfish *Carassius auratus*: a case study from Italy. In: *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Springer. Vol. ۱۵, pp: ۲۵۹-۲۷۳.
  ۱۶. Motlagh, H.R.A.; Farhangi, M.; Rafiee, G. and Noori, F., ۲۰۱۲. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Aquaculture International*. Vol. ۲۰, pp: ۶۹۳-۷۰۵.
  ۱۷. Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Endo, M.; Katagiri, T.; Ponpornpisit, A.; Chansue, N. and Maita, M., ۲۰۱۱. Modulation of intestinal morphology and immunity innile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in veterinary science*. Vol. ۹۱, pp: ۹۲-۹۷.
  ۱۸. Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Rodkhum, C.; Chansue, N.; Ooi, E.L.; Katagiri, T. and Maita, M., ۲۰۱۵. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. ۲۰۷, pp: ۹۳-۱۰۳.
  ۱۹. Rahimnejad, S.; Agh, N.; Kalbassi, M. and Khosravi, S., ۲۰۱۲. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth, haematology and non-specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. Vol. ۴۳, pp: ۱۴۵۱-۱۴۵۹.
  ۲۰. Ramos, M.A.; Gonçalves, J.F.; Costas, B.; Batista, S.; Lochmann, R.; Pires, M.A.; Rema, P. and Ozório, R.O., ۲۰۱۶. Commercial Bacillus probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. *Aquaculture Research*. Vol. ۹۱, pp: ۹۲-۹۷.
  ۲۱. Rodríguez, Saint-Jean S.; Pérez Prieto, S.I.; López-Expósito, I.; Ramos, M.; de las Heras, A.I. and Recio, I., ۲۰۱۲. Antiviral activity of dairy proteins and hydrolysates on salmonid fish viruses. *International Dairy Journal*. Vol. ۲۳, pp: ۲۴-۲۹.
  ۲۲. Sherman, M.P.; Bennett, S.H.; Hwang, F.F. and Yu, C., ۲۰۰۴. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *Biometals*. Vol. ۱۷, pp: ۲۸۵-۲۸۹.
  ۲۳. Spanò, L.; Tyler, C.R.; Aerle, R.v.; Devos, P.; Mandiki, S.; Silvestre, F.; Thomé, J.P. and Kestemont, P., ۲۰۰۴. Effects of atrazine on sex steroid dynamics plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic toxicology*. Vol. ۶۶, pp: ۳۶۹-۳۷۹.
  ۲۴. Takayama, Y., ۲۰۱۲. Lactoferrin Structure Function and Genetics. In: *Lactoferrin and its Role in Wound Healing*. Springer. pp: ۴۳-۶۶.
  ۱. سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ صفحه.
  ۲. مشکوه روحانی، آ.؛ عابدیان کناری، ع. و شریعتمداری، ف.، ۱۳۸۶. تأثیر نسبت‌های مختلف کربوهیدرات به چربی در دو سطح متفاوت از پروتئین بر رشد، ترکیبات بدن و شاخص هیپاتوسوماتیک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). ۱۳۸۶. منابع طبیعی ایران. سال ۶، شماره ۱، صفحات ۱۶۱ تا ۱۷۵
  ۳. Blottière, H.M.; Buecher, B.; Galmiche, J.P. and Cherbut, C., ۲۰۰۳. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society*. Vol. ۶۲, pp: ۱۰۱-۱۰۶.
  ۴. Carnevali, O.; Avella, M. and Gioacchini, G., ۲۰۱۳. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General and comparative endocrinology*. Vol. ۱۸۸, pp: ۲۹۷-۳۰۲.
  ۵. Esteban, M.A.; Rodríguez, A.; Cuesta, A. and Meseguer, J., ۲۰۰۵. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Fish & shellfish immunology*. Vol. ۱۸, pp: ۱۰۹-۱۲۴.
  ۶. Garg, S., ۲۰۱۵. Effect of dietary probiotic mix (SPILAC) on growth performance and nutritive physiology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linn.) under laboratory conditions. Vol. ۳, pp: ۴۴۰-۴۴۶.
  ۷. Ghosh, S.; Sinha, A. and Sahu, C., ۲۰۰۷. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*. Vol. ۳۸, pp: ۵۱۸-۵۲۶.
  ۸. Gioacchini, G.; Maradonna, F.; Lombardo, F.; Bizzaro, D.; Olivotto, I. and Carnevali, O., ۲۰۱۰. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction*. Vol. ۱۴۰, pp: ۹۵۳-۹۵۹.
  ۹. González-Chávez, S.A.; Arévalo-Gallegos, S. and Rascón Cruz, Q., ۲۰۰۹. Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents*. Vol. ۳۳, pp: ۳۰۱-۳۰۸.
  ۱۰. Guerrero, H.; Cardillo, E.; Poleo, G. and Marcano, D., ۲۰۰۹. Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. *Fish physiology and biochemistry*. Vol. ۳۵, pp: ۱۸۹-۱۹۶.
  ۱۱. Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., ۲۰۱۵. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish & shellfish immunology*. Vol. ۴۲, pp: ۵۳۳-۵۳۸.
  ۱۲. Krogdahl, Å.; Sundby, A. and Olli, J.J., ۲۰۰۴. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture*. Vol. ۲۲۹, pp: ۳۳۵-۳۶۰.
  ۱۳. Lebeer, S.; Vanderleyden, J. and De, Keersmaecker, S.C., ۲۰۰۸. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic

۲۵. Tannock, G.W., ۲۰۰۴. A special fondness for lactobacilli. Applied and environmental microbiology. Vol. ۷۰, pp: ۳۱۸۹-۳۱۹۴.
۲۶. Tian, H.; Maddox, I.S.; Ferguson, L.R. and Shu, Q., ۲۰۱۰. Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. Biometals. Vol. ۲۳, pp: ۵۹۳-۵۹۶.
۲۷. Tomita, M.; Wakabayashi, H.; Shin, K.; Yamauchi, K.; Yaeshima, T. and Iwatsuki, K., ۲۰۰۹. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie. Vol. ۹۱, pp: ۵۲-۵۷.
۲۸. Topic Popovic, N.; Strunjak-Perovic, I.; Sauerborn Klobucar, R.; Barisic, J.; Jadan, M.; Kazazic, S.; Kesner Koren, I.; Prevendar, Crnic, A.; Suran, J. and Beer Ljubic B., ۲۰۱۶. The effects of diet supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* on tissue parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research. Vol. ۲۳, pp: ۵۹۳-۵۹۶.
۲۹. Yokoyama, S.; Koshio, S.; Takakura, N.; Oshida, K.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F.J.; Catacutan, M.R. and Teshima, S.i., ۲۰۰۶. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture. Vol. ۲۵۵, pp: ۵۰۷-۵۱۳.
۳۰. Zhang, C.N.; Li, X.F.; Xu, W.N.; Zhang, D.D.; Lu, K.L.; Wang, L.N.; Tian, H.Y. and Liu, W.B., ۲۰۱۵. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and gut histology of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Aquaculture Nutrition. Vol. ۲۱, pp: ۷۵۵-۷۶۶.

