تأثیر استفاده از لاکتوفرین و *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 در جیره‌غذایی 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 محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
- **عبدالمجید حاجی مرادلو:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
- **رسول قربانی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
- **ناصر آق:** پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: اردیبهشت 1395 تاریخ پذیرش: مرداد 1395

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر استفاده از لاکتوفرین و *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 به مدت ۱۲۰ روز بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک مولدین ماده کاراس طلایی (*Carassius auratus*) (میانگین وزن ۲۱/۵۰±۱۲/۰ گرم) طراحی شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار اول: باکتری*L. rhamnosus* PTCC 1637 (10^6باکتری در گرم جیره)، تیمار دوم: لاکتوفرین (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)، تیمار سوم: تیمار ترکیبی *L. rhamnosus* PTCC 1637 (10^6باکتری در گرم جیره) به همراه لاکتوفرین (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و شاهد (جیره غذایی بدون افزودنی) در سه تکرار بود. نتایج نشان داد شاخص‌های کبدی (6/05±1/02)و روده‌ای (6/97±1/07) به‌صورت معنی‌داری در تیمار یک افزایش یافت ($p<0/05$). بالاترین درصد شاخص گنادی (19/58±0/82) در تیمار یک به دست آمد ($p<0/05$) مطالعات بافت‌شناسی روده نشان داد طول (330 میکرومتر)، عرض (109 میکرومتر) و مساحت (112946 میکرومتر مربع) سطح جذبی پرزهای روده در تیمار یک بیشتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود ($p<0/05$). در پایان دوره آزمایش، تخمدان ماهیان شاهد، تیمار اول و دوم در مرحله V رسیدگی جنسی قرار داشتند درحالی‌که تیمار سوم در ابتدای مرحله IV جنسی قرار داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از *L. rhamnosus* PTCC 1637 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 1637، لاکتوفرین، شاخص‌های فیزیولوژیک

مقدمه

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 آبزی‌پروری، تأمین بهینه مواد مغذی ضروری است. امروزه علاوه بر مواد مغذی اصلی، استفاده از محرک‌های رشد در صنعت آبزی‌پروری بسیار مورد توجه است، استفاده از مکمل‌هاي غذایی میکروبی و به ویژه پروبیوتیک‌ها در طی دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده و تحقیقات گسترده‌اي در این خصوص صورت پذیرفته است (Hoseinifar و همکاران، 2015). این تحقیقات عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات بر شاخص‌هاي رشد (Motlagh و همکاران، 2012)، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماري (Hoseinifar و همکاران، 2015) بوده است.

جنس لاکتوباسیل از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین پروبیوتیک‌های آبزیان می‌باشد که بیش از 50 گونه را شامل می‌شود (Tannock، 2004). این باکتری‌ها، تعداد زیادی مواد با قابلیت اثر گذاری بر سطح و درون سلول تولید و ترشح می‌کنند (Lebeer و همکاران، 2008). مطالعات ترانسکریپتومیک[1] و پروتئومیک[2] نشان داده است که تعداد زیادی از نئوپروتئین‌های[3] 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، 2013).

[1] transcriptomic
[2] proteomic
[3] neoproteins

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hamid.ahmadnia@gmail.com

علاوه بر پروبیوتیک‌ها سایر افزودنی‌های خوراکی طبیعی، مانند لاکتوفرین مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rodríguez و همکاران، 2012). لاکتوفرین یکی از گلیکوپروتئین‌های موجود در شیر می‌باشد که در سایر ترشحات مخاطی پستانداران نیز یافت می‌شود (González و همکاران، 2009). 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، 2005)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Takayama و همکاران، 2011)، تنظیم جذب آهن و رشد و تکثیر ماکروفاژها، تنظیم تولید رادیکال هیدروکسیل به‌وسیله ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها (سلطانی 1387) 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 18 و دیگر سایتوکین‌ها توسط 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 (Tomita و همکاران، 2009؛ Rahimnejad و همکاران، 2012).

در حالی که مطالعات متعددی به بررسی اثر پروبیوتیک‌های مختلف بر شاخص‌های فیزیولوژیک آبزیان مانند شاخص‌های گنادی(Carnevali و همکاران، 2013)، روده‌ای (Zhang و همکاران، 2015؛ Ramos و همکاران، 2016؛ Topic و همکاران، 2016) و کبدی (López و همکاران، 2014؛ Garg و همکاران، 2015) پرداخته‌اند، اطلاعاتی پیرامون نحوه اثر لاکتوفرین یا ترکیب لاکتوفرین و پروبیوتیک، بر بافت کبد، روده و گناد آبزیان یافت نشد. آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر استفاده از لاکتوفرین و باکتری *L. rhamnosus* PTCC 1637 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 (3 تیمار آزمایشی به همراه یک تیمار شاهد و هریک در 3 تکرار) اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار یک: (*Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 (10^6 باکتری در هر گرم غذا)) تیمار دو: (200 میلی‌گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا)، تیمار سوم: ترکیب (*L. rhamnosus* PTCC 1637 (10^6باکتری در هر گرم غذا به علاوه لاکتوفرین 200 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 48 ساعت در محیط کشت MRS Broth (آلمان، ®Merck) و دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. جهت تعیین میزان تراکم باکتری، از روش تراکم سنجی نوری در طول موج 620 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 آزمایشي، لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 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 به مقدار 4 گرم به ازای هر کیلوگرم غذا استفاده شد. غذاي 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 $4\ ^{o}c$ 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، 225 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 آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان و طی کردن مراحل سازگاری، به‌صورت تصادفی بین تیمارهای آزمایشی تقسیم شدند تغذیه به میزان 2/5 درصد وزن بدن و سه بار در روز به مدت 120 روز با جیره مخصوص ماهیان زینتی (®Energy) انجام شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب نظیر دما، مقدار اکسیژن محلول و پی اچ منطبق بر شرایط استاندارد پرورشی (Lorenzoni و همکاران، 2007) تنظیم شد. منبع آب مورد استفاده براي پرورش، از آب لوله کشی شهری پس از حذف کلر تأمین و در طول دوره پرورش بچه ماهیان از نظر ظاهري و نحوه حرکت و رفتارهای تغذیه‌ای مورد بررسي قرار گرفتند. تعویض روزانه آب به میزان یک‌سوم حجم آب مخازن پرورشی بود.

اندازه‌گیری شاخص‌های مورد مطالعه: نمونه‌برداری به‌منظور برآورد وزن کل تخمدان، کبد و روده مولدین ماده، در پایان آزمایش با بی‌هوش کردن ماهی توسط پودر گل‌میخک (5 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 بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند. لازم به ذکر است که معیار تمامی وزن‌ها بر اساس گرم می‌باشد.

بافت‌شناسی تخمدان، بیضه، روده و کبد: به‌منظور بررسی اثرات تیمارهای مختلف بر هیستومورفولوژی تخمدان و روده ماهیان مولد کاراس طلایی، در ابتدا، میانه (پس از گذشت 30 روز از غذادهی) و پایان دوره آزمایش، پس از یک روز قطع غذادهی، از هر تیمار 3 ماهی به‌طور 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 فرمالین 10 درصد تثبیت شدند. رنگ‌آمیزی بافت‌ها به روش هماتوکسیلین - ائوزین و طبق دستورالعمل Khodabandeh و همکاران، 2005 صورت گرفت. عکس‌برداری از بافت توسط میکروسکوپ نوری مجهز به

دوربین دیجیتال صورت گرفت. جهت تجزیه‌وتحلیل عکس‌های تهیه شده و اندازه گیری طول، عرض و مساحت سطح جذبی پرزهای روده از نرم‌افزار Imaje J 150 استفاده شد. مساحت سطح جذبی پرزهای روده بر اساس فرمول زیر به دست آمد. π معادل 3/14 در نظر گرفته شد.

مساحت سطح جذبی پرزهای روده (میکرومتر مربع)
= (طول پرز (میکرومتر))
× (عرض پرز (میکرومتر)) × π

بررسی روند رسیدگی جنسی در طول دوره پرورش: لام‌های بافت‌شناسی تخمدان به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین مورد مطالعه قرار گرفتند. تائید مراحل مختلف رسیدگی جنسی طبق دستورالعمل ارائه شده توسط (McMillan، 2007) صورت گرفت (شکل 1). تشخیص مراحل رسیدگی تخمدان با استفاده از شمارش حداقل یک‌صد اووسیت و برحسب قرار گرفتن اکثر اووسیت‌ها در مراحل تعریف شده صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: بعد از آزمون نرمال بودن و همگن بودن داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه براي مقایسه میانگین بین تیمارها و از آزمون دانکن براي بررسي وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها (در سطح اعتماد 5 درصد) با نرم افزار آماري SPSS, 17 تحت ویندوز استفاده شد.

شاخص گنادی (درصد) = ((وزن کبد)/(وزن کبد)) × ۱۰۰

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

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

نتایج

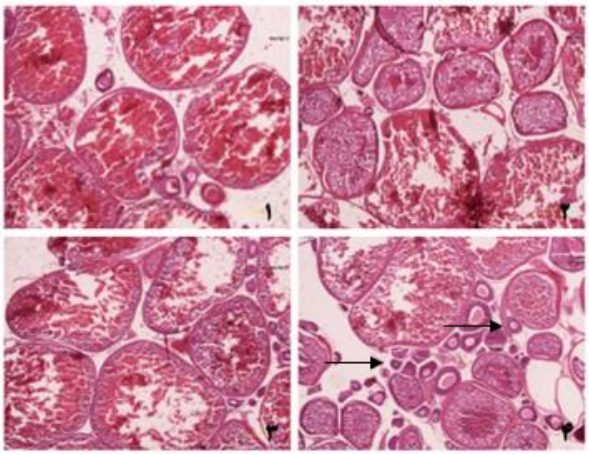
شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی: میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی در پایان دوره آزمایش در جدول 1 ارائه شده است. با توجه به نتایج، تیمار شاهد کمترین و تیمار یک، بیشترین میزان شاخص کبدی را داشتند ($p<0/05$). شاخص روده‌ای در تیمار یک بالاترین مقدار را نشان داد و از این نظر با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین (±58/19/82) و کمترین (6/82±0/69) شاخص گنادی به ترتیب در تیمارهای یک و سه مشاهده شد. شاخص گنادی بین تیمارها تفاوت معنی‌داردار داشت ($p<0/05$).

جدول1: میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های کبدی، روده‌ای و گنادی ماهیان مولد ماده کاراس طلایی تغذیه شده با لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 در تیمارهای آزمایشی در پایان دوره آزمایش (n = 3)

تیمار	شاخص کبدی (درصد)	شاخص روده‌ای (درصد)	شاخص گنادی (درصد)
شاهد	۴/۳۴±۰/۸۲^{a}	۵/۰۱±۰/۶۵^{a}	۱۶/۸۴±۲/۹۲^{b}
تیمار اول	۶/۰۵±۱/۰۲^{b}	۶/۹۷±۱/۰۷^{b}	۱۹/۵۸±۰/۸۲^{b}
تیمار دوم	۴/۵۴±۰/۲۱^{ab}	۶/۳۳±۰/۵۵^{ab}	۱۹/۵۱±۴/۸۵^{b}
تیمار سوم	۴/۵۴±۱/۱۸^{ab}	۴/۹۶±۰/۰۵^{a}	۶/۸۲±۰/۶۹^{a}

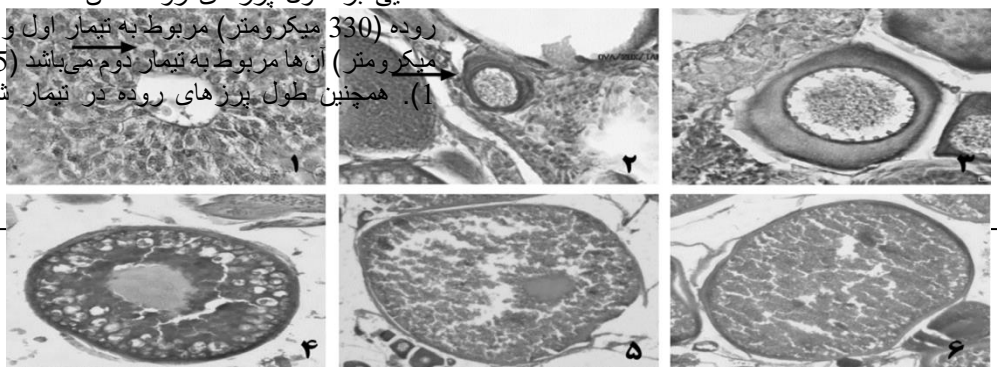
* داده‌های ارائه شده در هر ستون با حروف غیرمشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($p<0/05$)

بافت‌شناسی تخمدان: نتایج به دست آمده نشان داد (شکل 2) 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 2: بافت تخمدان در انتهای دوره آزمایش بزرگنمایی × 4 رنگ-آمیزی هماتوکسیلین-انوزین 1) تیمار دوم 2) تیمار شاهد 3) تیمار اول 4) تیمار سوم. تخمک‌های نارس در تیمار سوم با فلش نشان داده شده‌اند.

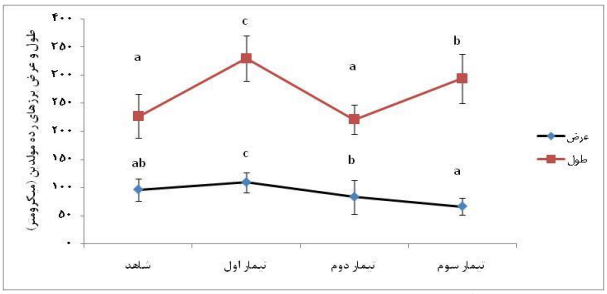
بافت‌شناسی روده: تأثیر استفاده از لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 در جیره غذایی مولدین ماهی کاراس طلایی بر طول پرزهای روده نشان داد که بلندترین پرزهای روده (330 میکرومتر) مربوط به تیمار اول و کوتاه‌ترین (221 میکرومتر) آن‌ها مربوط به تیمار دوم می‌باشد ($p<0/05$) (نمودار 1). همچنین طول پرزهای روده در تیمار شاهد نیز اختلاف



شکل 1: مراحل مختلف رسیدگی جنسی در تخمدان مولدین ماده کاراس طلایی در انتهای دوره پرورش.
رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – انوزین. 1- اووگونی‌های تولید شده توسط لایه زاینده در تخمدان ماهی کاراس طلایی.
تخمدان در مرحله رسیدگی جنسی I. بزرگنمایی× 40. 2- سلول‌های اووگونیای رشد یافته. انتهای مرحله I.

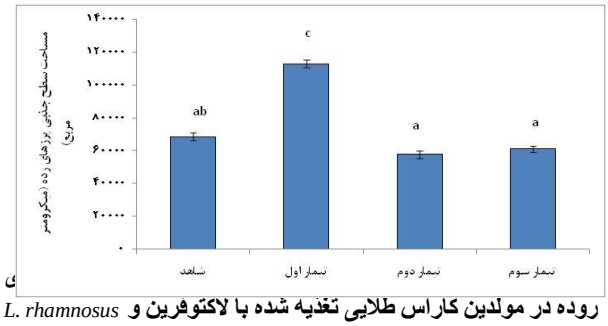
معنی‌داری با تیمار اول نشان داد (p<0/05). تیمار شاهد با تیمار سوم اختلاف معنی‌داری نداشت.

داده‌های مربوط به عرض پرزهای روده (نمودار 1) نشان داد که بیشترین عرض پرزهای روده (109 میکرومتر) مربوط به تیمار اول و کمترین (66 میکرومتر) آن مربوط به تیمار سوم می‌باشد (p<0/05). تیمار شاهد تنها با تیمار اول اختلاف معنی‌دار نشان داد (p<0/05).



نمودار 1: میانگین (± انحراف معیار) طول و عرض پرزهای روده در مولدین کاراس طلایی تغذیه شده با لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 در تیمارهای مختلف (n= 3)

همچنین نتایج مساحت سطح جذبی پرزهای روده نشان داد که بیشترین مساحت سطح جذبی (112946 میکرومتر مربع) مربوط به تیمار اول و کمترین (57597 میکرومتر مربع) آن مربوط به تیمار سوم می‌باشد (p<0/05) (نمودار 2). تیمار شاهد تنها با تیمار اول اختلاف معنی‌دار نشان داد (p< 0/05).



روده در مولدین کاراس طلایی تغذیه شده با لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 و در تیمارهای مختلف (n= 3)

بحث

شاخص گنادی ابزار مناسبی برای نظارت بر پیشرفت گامتوژنز در ماهیان استخوانی می‌باشد (Guerrero و همکاران، 2009). افزایش شاخص گنادی در تیمار دریافت‌کننده *L. rhamnosus* PTCC 1637 و لاکتوفرین نسبت به تیمار ترکیبی و شاهد قابل مشاهده بود. ارتقای شاخص گنادی در 4 گونه از ماهیان زنده‌زای گوپی (*Poecilia reticulate*)، مولی (*Poecilia sphenops*)، دم شمشیری سبز (*Xiphophorus helleri*) و پلاتی (*Xiphophorus maculatus*)(Ghosh و همکاران، 2007) و همچنین در ماهی *Fundulus heteroclitus* (Lombardo و همکاران، 2011) که به ترتیب با باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *L. rhamnosus* PTCC 1637 تیمار شده بودند نیز گزارش شده است. همچنین نتایج نشان داد که تیمارهای دریافت کننده لاکتوفرین و *L. rhamnosus* PTCC 1637 در پایان آزمایش در مرحله جنسی V قرار داشته در حالی که تیمار ترکیبی در مرحله III و آغاز مرحله IV قرار داشتند. احتمالاً لاکتوفرین با اعمال محدودیت رشد علیه باکتری‌های بیماری‌زای یا خنثی روده می‌تواند شرایط رشد بهتری را برای باکتری‌های مفید دستگاه گوارش از جمله باکتری‌های اسیدلاکتیک 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، 2007) 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، 2004). شاخص کبدی در ماهیان ماده تیمار شده با *L. rhamnosus* PTCC 1637 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، 2014). همچنین در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تیمار شده با مخلوط پروبیوتیکی SPILAC شاخص کبدی افزایش یافت (Garg، 2015). کبد ماهی ماده محتوی سطح بالایی از گیرنده‌های استروژنی است که اجازه تولید ویتلوژنین و پروتئین‌های پوشش زرده را به دنبال تحریک استروژنی می‌دهد. این گیرنده‌ها در کبد ماهیان نر و ماده‌های نابالغ نیز وجود دارد که به علت عدم‌تحریک غیرفعال می‌باشند(Spanò و همکاران، 2004). لذا، با توجه به داده‌های بافت‌شناسی تخمدان و افزایش ذخیره زرده اووسیت‌ها در مراحل پایانی رشد جنسی، به نظر می‌رسد به علت شدت گرفتن ویتلوژنز و لیپوژنز در کبد (مشکوه روحانی و همکاران، 1386)، 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 دریافت کننده 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* PTCC 1637 در جیره‌غذایی ماهی تیلاپیای نیل مشاهده شد (Pirarat و همکاران، 2011 و 2015). مکانیسم احتمالی درگیر در توسعه پرزهای روده در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک، کلنی سازی 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 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، 2003)؛ 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، 2006) در عدم تکثیر بهینه سلول‌های موجود در پرزهای روده دخیل می‌باشند. علاوه بر راین، مطالعات نشان داده‌اند که لاکتوفریسین حاصل از عمل پپسین بر لاکتوفرین در دستگاه گوارش دارای خواص ضدباکتریایی شدیدتری نسبت به لاکتوفرین می‌باشد (Takayama و همکاران، 2012)؛ بنابراین ممکن است با تولید لاکتوفریسین 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، 2010؛ Sherman و همکاران، 2004) 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 رنگین کمان (Ownagh و همکاران، 2013)، کاهش رشد را تائید 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، 2006). با توجه به اینکه ترکیب باکتری *L. rhamnosus* PTCC 1637 و لاکتوفرین به نوعی بازدارندگی رشد غدد جنسی را به همراه داشت، استفاده از این ترکیب جهت کنترل و ایجاد تأخیر در تولیدمثل پیشنهاد می‌شود.همچنین با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از *L. rhamnosus* PTCC 1637 به دلیل افزایش سطح جذبی پرزهای روده، می‌تواند گزینه مناسبی جهت افزایش بهره‌وری غذایی و لاکتوفرین به دلیل 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 جافر جهت در اختیار قرار دادن امکانات و همکاری در انجام مراحل عملی آزمایش حاضر، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. **سلطانی، م.، 1387.** ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان، انتشارات دانشگاه تهران. 264 صفحه.
2. **مشکوه روحانی، آ.؛ عابدیان کناری، ع. و شریعتمداری، ف.، 1386.** تأثیر نسبت‌های مختلف کربوهیدرات به چربی در دو سطح متفاوت از پروتئین بر رشد، ترکیبات بدن و شاخص هپاتوسوماتیک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). 1386. منابع طبیعی ایران. سال 60، شماره 1 ، صفحات 161تا 175
3. **Blottière, H.M.; Buecher, B.; Galmiche, J.P. and Cherbut, C., 2003.** Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceedings of the Nutrition Society. Vol. 62, pp: 101-106.
4. **Carnevali, O.; Avella, M. and Gioacchini, G., 2013.** Effects ofprobiotic administration on zebrafish development and reproduction. General and comparative endocrinology. Vol. 188, pp: 297-302.
5. **Esteban, M.A; Rodríguez, A.; Cuesta, A. and Meseguer, J., 2005.** Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). Fish & shellfish immunology. Vol. 18, pp: 109-124.
6. **Garg, S., 2015.** Effect of dietary probiotic mix (SPILAC) on growth performance and nutritive physiology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linn.) under laboratory conditions. Vol. 3, pp: 440-446.
7. **Ghosh, S.; Sinha, A. and Sahu, C., 2007.** Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 518-526.
8. **Gioacchini, G.; Maradonna, F.; Lombardo, F.; Bizzaro, D.; Olivotto, I. and Carnevali, O., 2010.** Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). Reproduction. Vol. 140, pp: 953-959.
9. **González-Chávez, S.A.; Arévalo-Gallegos, S. and Rascón-Cruz, Q., 2009.** Lactoferrin: structure, function and applications. International journal of antimicrobial agents. Vol. 33, pp: 301-308.
10. **Guerrero, H.; Cardillo, E.; Poleo, G. and Marcano, D., 2009.** Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. Fish physiology and biochemistry. Vol. 35, pp: 189-196.
11. **Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of Lactobacillusacidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & shellfish immunology. Vol. 42, pp: 533-538.
12. **Krogdahl, Å.; Sundby, A. and Olli, J.J., 2004**. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. Aquaculture. Vol. 229, pp: 335-360.
13. **Lebeer, S.; Vanderleyden, J. and De, Keersmaecker, SC., 2008**. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 72, pp: 728-764.
14. **López, L.M.; Olmos, J.; Trejo, Escamilla, I.; Flores, Ibarra, M.; Ochoa, L.; Drawbridge, M. and Peres, H., 2014**.

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 1860). Aquaculture Research. Vol. 56, pp: 1120-1136.

15. **Lorenzoni, M., Corboli, M.; Ghetti, L.; Pedicillo, G. and Carosi, A., 2007**. 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. 15, pp: 259-273.
16. **Motlagh, H.R.A.; Farhangi, M.; Rafiee, G. and Noori, F., 2012**. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of Artemia urmiana by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Aquaculture International. Vol. 20, pp: 693-705.
17. **Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Endo, M.; Katagiri, T.; Ponpornpisit, A.; Chansue, N. and Maita, M., 2011**. Modulation of intestinal morphology and immunity innile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in veterinary science. Vol. 91, pp: 92-97.
18. **Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Rodkhum, C.; Chansue, N.; Ooi, E.L.; Katagiri, T. and Maita, M., 2015.** 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. 207, pp: 93-103.
19. **Rahimnejad, S.; Agh, N.; Kalbassi, M. and Khosravi, S., 2012.** Effect of dietary bovine lactoferrin on growth, haematology and non-specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research. Vol. 43, pp: 1451-1459.
20. **Ramos, M.A.; Gonçalves, J.F.; Costas, B.; Batista, S.; Lochmann, R.; Pires, M.A.; Rema, P. and Ozório, RO., 2016.** Commercial Bacillus probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. Aquaculture Research. Vol. 91, pp: 92-97.
21. **Rodríguez, Saint-Jean S.; Pérez Prieto, S.I.; López-Expósito, I.; Ramos, M.; de las Heras, A.I. and Recio, I., 2012.** Antiviral activity of dairy proteins and hydrolysates on salmonid fish viruses. International Dairy Journal. Vol. 23, pp: 24-29.
22. **Sherman, M.P.; Bennett, S.H.; Hwang, F.F. and Yu, C., 2004.** Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG. Biometals. Vol. 17, pp: 285-289.
23. **Spanò, L.; Tyler, C.R.; Aerle, R.v.; Devos, P.; Mandiki, S.; Silvestre, F.; Thomé, J.P. and Kestemont, P., 2004.** Effects of atrazine on sex steroid dynamics ,plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). Aquatic toxicology. Vol. 66, pp: 369-379.
24. **Takayama, Y., 2012.** Lactoferrin Structure Function and Genetics. In: Lactoferrin and its Role in Wound Healing. Springer. pp: 43-66.
25. **Tannock, G.W., 2004.** A special fondness for lactobacilli. Applied and environmental microbiology. Vol. 70, pp: 3189-3194.
26. **Tian, H.; Maddox, I.S.; Ferguson, L.R. and Shu, Q., 2010.** Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens .Biometals. Vol. 23, pp: 593-596.
27. **Tomita, M.; Wakabayashi, H.; Shin, K.; Yamauchi, K.; Yaeshima, T. and Iwatsuki, K., 2009.** Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie. Vol. 91, pp: 52-57.
28. **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., 2016.** The effects of diet supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* on tissue parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research. Vol. 23, pp: 593-596.
29. **Yokoyama, S.; Koshio, S.; Takakura, N.; Oshida, K.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F.J.; Catacutan, M.R. and Teshima, S-i., 2006.** 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. 255, pp: 507-513.
30. **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., 2015.** 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. 21, pp: 755-766.