مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی

دوره ۲۰، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۶۳ تا ۷۵

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

تاثیر استفاده از سین‌بیوتیک تولید شده از عصاره قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) همراه با دو گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیب لاشه، رشد و فلور میکروبی روده در ماهی زبرا (*Danio rerio*)

حمیده ذکریائی [۱]، محمدسوداگر [۱*]، سیده صدیقه حسینی [۲و۳]، حامد پاکنژاد [۱]، کارتیک باروآه [۴]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۴. گروه مدیریت و تغذیه حیوانات، دانشکده علوم حیوانات و داروهای دامپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، اوپسالا، سوئد.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sudagar_m@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۷ **تاریخ بازنگری:** ۱۳۹۹/۰۸/۰۹ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۸/۱۱

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2020.233183.2375

چکیده

این تحقیق جهت بررسی تاثیر دو گونه از پروبیوتیک‌های جنس لاکتوباسیلوس، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (*Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) و عصاره قارچ دکمه‌ای(*Agaricus bisporus*) به صورت مجزا و توام بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیب لاشه، بازماندگی، رشد و فلور میکروبی روده در ماهی زبرا (*Danio rerio*) انجام شد. برای این منظور، ۷ جیره آزمایشی در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. بچه ماهیان یک ماهه زبرا با میانگین وزنی۱± ۷۵/۹ میلی‌گرم به مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی شامل: جیره فاقد پروبیوتیک و پربیوتیک (جیره یک)، جیره حاوی ۱٪ عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک (جیره دو)، جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (جیره سه)، جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (جیره چهار)، جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به همراه ۱٪ عصاره قارچ دکمه‌ای (جیره پنج)، جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به همراه ۱٪ عصاره قارچ دکمه‌ای (جیره شش)، جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به همراه ۱٪ عصاره قارچ دکمه‌ای (جیره هفت) تغذیه شدند و در انتهای دوره جهت بررسی فاکتورهای مذکور نمونه‌برداری به طور تصادفی صورت گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین افزایش رشد، نرخ رشد ویژه و کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای سین‌بیوتیکی مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنادار داشت ($P<0/05$)؛ با این حال، در میزان بازماندگی تمامی تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنادار مشاهده نشد ($P>0/05$)، هم‌چنین، بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی در تیمار تغذیه شده با جیره غذایی هفت مشاهده شد که با سایر تیمارها و تیمار شاهد دارای تفاوت معنادار بود ($P<0/05$)، در ارتباط با ترکیب شیمیایی بدن، میزان پروتئین در تیمار تغذیه شده با جیره هفت مشاهده گردید که با تیمار شاهد تفاوت معنادار داشت ($P<0/05$)؛ اگرچه، این تفاوت در میزان چربی، خاکستر و رطوبت بدن بین تیمار شاهد با سایر تیمارها معنادار نبود ($P>0/05$). تعداد کل باکتری‌های فلور میکروبی روده و باکتری‌های اسیدلاکتیک در انتهای دوره در تمانی تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنادار داشت ($P<0/05$)؛ اگرچه، در تعداد این باکتری‌ها ۱۰ روز پس از توقف افزودن مکمل‌ها در جیره‌های آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P>0/05$). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، افزودن سین‌بیوتیک حاوی پروبیوتیک‌های مذکور جنس لاکتوباسیلوس و عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان سین‌بیوتیک می‌تواند تاثیر مثبتی در شاخص‌های رشد و آنزیم‌های گوارشی ماهی زبرا گذاشته و افزودن این ترکیب در جیره غذایی ماهی زبرا توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: ماهی زبرا، قارچ دکمه‌ای، باکتری‌های لاکتوباسیلوس، آنزیم‌های گوارشی.

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱. مقدمه

پرورش آبزیان به عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود (Morshedi et al., 2018). در سال‌های اخیر، استفاده از تکنیک‌های نوین علمی مانند: عوامل موثر در بهبود عملکرد رشد، فرایند تکثیر و تولیدمثل و ایمنی آبزیان مورد توجه آبزی‌پروران بوده است (Izquierdo et al, 2001). تامین جیره‌ی غذایی مناسب و متناسب با نیاز موجود و هم‌چنین فراهم بودن عوامل محیطی مناسب را می‌توان از اصلی‌ترین عوامل تاثیرگذار بر عملکرد رشد و بهبود فرآیند تولیدمثلی مولدین پرورشی برشمرد (Wooster et al., 2000)؛ از این‌رو، از مواد و افزودنی‌هایی در بهبود کیفیت روند تولید و پرورش آبزیان استفاده می‌شود که از جمله‌ی آن می‌توان به پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها اشاره نمود (Vine et al., 2004; Jeong et al., 2017). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده‌ای هستند که از طریق ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، اثرات سودمندی بر رشد و سلامتی می‌گذارند. به دلیل تحولی که پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری ایجاد کرده‌اند، استفاده از آن‌ها روز به روز در حال گسترش است و امروزه در مناطق مختلف دنیا در صنعت پرورش آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Agh et al., 2019)، چراکه تحقیقات انجام یافته و تجربیات به دست آمده نشان داده است که در بسیاری از گونه‌های ماهی و میگو پروبیوتیک‌ها باعث بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه (Taoka et al., 2006)، بهبود ترکیب شیمیایی لاشه (Morshedi et al., 2016; Paricheh et al., 2018) و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌گردد (Salinas et al., 2008). از طرف دیگر، در بعضی کشورها با مصرف این میکروارگانسیم‌های مفید، مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافته است. در این میان، باکتری‌ها شایع‌ترین نوع پروبیوتیک‌ها هستند که سویه‌های مختلفی از آن‌ها در آبزی‌پروری مورد بررسی قرار گرفته است (Mohapatra et al., 2012). پربیوتیک‌ها نیز، اجزای غذایی غیر قابل هضم بوده که از طریق تحریک و رشد باکتری‌های ساکن در روده‌ی میزبان، سلامت آن‌ها را تأمین می‌نمایند (Sepehrfar et al., 2018). در واقع، استفاده از پربیوتیک‌ها به‌دلیل تخمیر گزینشی توسط باکتری‌های مفید روده، سبب افزایش تعداد و غالبیت آن‌ها می‌شوند (Roberfroid, 2007). یکی از این اجزای غذایی مهم، کربوهیدرات‌ها یا به طور اختصاصی‌تر الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم می‌باشند (Ghobadi et al., 2011). اولیگوساکاریدهای غیر قابل هضم کربوهیدرات‌هایی با وزن مولکولی کم هستند که از لحاظ ساختاری حدواسط بین قندهای ساده و پلی‌ساکاریدها هستند. این ترکیبات از راه‌های متعددی از جمله: عصاره‌گیری مستقیم از مواد طبیعی، فرآیند هیدرولیز شیمیایی پلی‌ساکاریدها و یا توسط سنتز آنزیمی و شیمیایی دی‌ساکاریدها به دست می‌آید (Pour Amini and Hoseinifar, 2007). از جمله مواد غذایی که دارای ترکیبات حاوی پلی‌ساکاریدهای غیرقابل هضم می‌باشند، می‌توان به قارچ خوراکی اشاره کرد (Roberfroid et al., 1998; Imasse et al., 2005; Roberfroid, 2007; Kedia et al., 2007; Ijabadeniyi, 2007; Loponen, 2007). قارچ خوراکی دکمه‌ای با نام علمی *Agaricus bisporus* منبع خوبی از کربوهیدرات‌های غیر نشاسته‌ای، فیبر، پروتئین، موادمعدنی و ویتامین‌ها شامل: عناصر پتاسیم، سدیم و فسفر، ترکیباتی مانند: اسیدلینولئیک، آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتوکاتکوئیک اسید می‌باشد (Del Signore et al., 1997; Shi et al., 2002; Chen et al., 2006). در سال‌های اخیر، از قارچ دکمه‌ای به عنوان منبع پربیوتیکی برای رشد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده شده است(Ghasi saravard et al., 2014).

ABD RAHMAN et al. (2012) از قارچ خوراکی به عنوان منبع غذایی پربیوتیکی در جیره غذایی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis nilotica*) استفاده کردند و نتایج حاصل از تحقیقات آن‌ها نشان داد که ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی قارچ خوراکی به عنوان یک مکمل پربیوتیکی دارای میانگین رشد بیشتری بودند. آن‌ها بیان کردند از آن‌جایی‌که قارچ خوراکی یک ترکیب خوراکی – دارویی می‌باشد؛ لذا، با توجه به دارا بودن الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم، سبب رشد رقابتی فلور باکتریایی مفید روده شده که این امر رشد و ایمنی ماهیان را بهبود می‌بخشد، اگرچه، استفاده از این ماده در جیره غذایی آبزیان محدود باقی ماند و تحقیقات زیادی لازم است که انجام شود، اما بیشتر پژوهش‌هایی که تاکنون روی قارچ‌ها صورت گرفته آن‌ها را به علت دارا بودن مقدار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به عنوان یک مکمل غذایی طبیعی تأیید کرده است. بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند با اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها منجر به فعال شدن آن‌ها شده و در نتیجه تقویت سیستم ایمنی و سلامت میزبان را سبب گردد. تیمارهای ترکیبی مخلوطی از باکتری‌های پروبیوتیکی و قارچ‌های خوراکی وجود دارند که از طریق بهبود قدرت حیات، تحریک رشد و متابولیسم یک یا چند باکتری اثرات مفیدی بر میزبان می‌گذارند. این ترکیب به دلیل دارا بودن یک اثر هم افزایی در بالا بردن کارایی دستگاه گوارش موفق می‌باشد (Hoseinifar, 2013). با این حال، باکتری‌های پروبیوتکی به کار برده شده در تغذیه به طور کامل قادر به حفظ غالبیت و پایدار خود در روده نیستند. یکی از ایده‌های نسبتا جدید مطرح شده برای افزایش غالبیت و رشد پایدار باکتری‌های پروبیوتیک در فلورمیکروبی دستگاه گوارش، استفاده همزمان آن‌ها با مواد مغذی برای مصرف یعنی پربیوتیک‌های مناسب به عنوان سوبسترا است (Rurangwa et al., 2009). بدین صورت می‌توان بهبود بازماندگی و استقرار مکمل میکروبی زنده را در دستگاه گوارش میزبان سبب شد. به همین جهت برای حل این مشکل، ایده سین‌بیوتیک و استفاده از آن

به عنوان مکمل غذایی شکل گرفت. Gibson et al. (1998) در طول ۱۰ سال گذشته مطالعاتی در ارتباط با استفاده از سین‌بیوتیک‌ها در آبزیان گسترش یافته و مقالات متعددی منتشر شده است. سین بیوتیک یک اثر سینرژیستی در بالا بردن کارآیی دستگاه گوارش دارد که به صورت مستقیم یا غیرمستقیم باعث تعدیل فلور میکروبی روده میزبان می‌شود. این ترکیبات باعث افزایش باکتری‌های مفید روده (باکتری‌های اسید لاکتیکی و برخی از گونه‌های مشخص باسیلوس‌ها)، افزایش رشد، بهبود کارآیی غذایی، بهبود ترکیب شیمیایی عضله میزبان و افزایش مقاومت به بیماری از طریق تحریک سیستم ایمنی میزبان می شوند (Merrifield et al., 2010). گونه‌های پروبیوتیکی انتخابی برای انجام تحقیق حاضر با تأکید بر مرور بر منابع و سابقه پیشین و بررسی سایر محققین، دو گونه از لاکتوباسیلوس‌ها شامل: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (*L. bulgaricus*) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیب لاشه، رشد و فلور میکروبی روده در ماهی زبرا (*Danio rerio*) به عنوان یک مدل زیستی و کاربردی بود.

۲. مواد و روش‌ها

این طرح آزمایشی طی ۸ هفته در سالن آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی گروه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۱۰۵۰ قطعه بچه ماهیان یک ماهه زبرا با میانگین وزنی۱± ۷۵/۹ از کارگاه خصوصی خریداری و درون هر یک از آکواریوم‌ها با ابعاد ۴۰×۳۰×۶۰ سانتی‌متر، تعداد۵۰ قطعه ماهی قرار داده شد. درجه حرارت مناسب برای این ماهیان در حد ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. ترکیب سین‌بیوتیکی شامل: هر دو جنس از باکتری‌های لاکتوباسیلوس و قارچ دکمه‌ای بود. برای انجام این آزمایش، یک جیره پایه (بلولاین: میکروپلت با اندازه ۰/۴میلی‌متر، ساخت کشور ایتالیا) و شش جیره آزمایشی برای لارو یک ماهه ماهی زبرا در نظر گرفته شد. تیمارهای در نظر گرفته شده شامل: گروه تغذیه شده با جیره پایه و فاقد پروبیوتیک و پربیوتیک به عنوان گروه شاهد (جیره یک)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک (جیره دو)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره (CFU = Colony Farming Unit) باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به عنوان پروبیوتیک (جیره سه)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به عنوان پروبیوتیک (جیره چهار)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به عنوان پروبیوتیک به همراه ۱ درصد عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک (جیره پنج)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به عنوان پروبیوتیک به همراه ۱ درصد عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک (جیره شش)، گروه تغذیه شده با جیره حاوی 10^7 سلول بر گرم جیره باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به صورت ترکیبی به عنوان پروبیوتیک به همراه ۱ درصد عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک (جیره هفت) بوده که در سه تکرار انجام شد. غذادهی به صورت دستی انجام شد و از غذاگیری ماهیان در آکواریوم اطمینان حاصل شد. تغذیه‌ی روزانه‌ی بچه ماهیان بر اساس ۵ درصد وزن توده‌ی زنده محاسبه و روزانه در ۴ نوبت (۹ ، ۱۱، ۱۳ و ۱۵) انجام گردید (Nouri et al., 2010). هم‌چنین، کشت جیره جهت اطمینان یافتن از میزان دسترسی به باکتری‌های مورد نیاز برای هر کدام از جیره‌های غذایی حاوی باکتری به طور مکرر هر هفته، انجام شد (Safari et al., 2017). آنالیز شیمیایی جیره تجاری ماهی زبرا بر اساس ماده خشک شامل: پروتئین خام (۶۰٪)، چربی خام (۱۷٪)، فیبر خام (۰/۵٪)، خاکستر (۱۰/۵٪)، سدیم کل (۰/۵٪)، کلسیم کل (۱/۸٪)، فسفر کل (۱/۵٪)، ویتامین A (۱۰۰۰۰ واحد بین المللی)، ویتامین D3 (۱۰۰۰ واحد بین المللی) و ویتامین E (۳۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) بود. در انتهای دوره، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تغذیه و اطمینان از دفع کامل محتویات لوله گوارش، شاخص‌های رشد و تغذیه اندازه‌گیری شد. برای این منظور، کل بچه ماهیان از هر تکرار نمونه‌گیری شد و پس از خشک کردن آب همراه آن‌ها، طول کل و وزن کل اندازه‌گیری گردید. وزن اولیه و نهایی بچه ماهیان با استفاده از ترازو (با دقت ۱ میلی‌گرم) و طول آن‌ها با استفاده از خط‌کش (با دقت ۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. شاخص‌های رشد تعیین‌شده در رابطه‌های ۱ تا ۵ آورده شده اند.

رابطه (۱) (Tacon, 1990):

[(میلی‌گرم) وزن اولیه بدن – (میلی‌گرم) وزن نهایی بدن)] = (میلی‌گرم) افزایش وزن بدن

رابطه (۲) (Bekcan et al., 2006):

۱۰۰ × [(میلی‌گرم) وزن اولیه بدن/ ((میلی‌گرم) وزن اولیه بدن – (گرم) وزن نهایی بدن)] = (%) درصد افزایش وزن بدن

رابطه (۳) (Hevrøy et al., 2005):

۱۰۰ × [طول دوره پرورش بر حسب روز / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن – لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)] = (روز/درصد وزنی) نرخ رشد ویژه

رابطه (۴) (Ai et al., 2006):

[(میلی‌گرم) افزایش وزن / (میلی–گرم) مقدار غذای مصرف شده] = ضریب تبدیل غذایی

رابطه (۵) (Ai et al., 2006):

۱۰۰ × (تعداداولیه ماهی/ تعداد نهایی ماهی) = (%) میزان بازماندگی

جهت بررسی تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) و همچنین تعدادکل کلنی‌های باکتری‌ها (TVC) موجود در میکروبیوتای روده، در انتهای دوره و ۱۰ روز پس از حذف مکمل‌های غذایی میکروبی از جیره به منظور بررسی پایداری تغیرات ایجاد شده در میکروبیوتای روده، کشت باکتری انجام شد. تعداد ۹ قطعه ماهی از هر تکرار انتخاب و جهت انجام بررسی‌های باکتریولوژیکی به صورت زنده در کیسه‌های پلاستیکی حمل ماهی قرار گرفته و بعد از انتقال به آزمایشگاه با دوز زیاد ماده بیهوشی گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشته شدند و روده هر ماهی به طور جداگانه جدا شد، اما، به دلیل ظریف و ریز بودن روده به طور احتمالی (نه با قطعیت) از لحاظ خالی بودن مورد بررسی قرار گرفت. پیش از بیرون آوردن روده، آماده‌سازی نمونه‌ها برای بررسی فلورمیکروبی روده بر اساس روش (Hoseinifar et al., 2011) و کشت با روش (Hoseinifar et al., 2017) انجام شد. پلیت‌هایی مورد قبول واقع شدند که بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد کلنی داشتند. جهت انجام آنالیزهای مربوط به ترکیب تقریبی لاشه از روش‌های بیان شده توسط (AOAC, 1990) استفاده شد. جهت محاسبه میزان رطوبت، نمونه کوبیده شده درون پتری‌دیشی که از قبل خشک و توزین شده بود، قرار داده شد و پتری‌دیش‌ها در داخل آون با دمای ۲±۱۰۳ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت و عمل خشک شدن تا زمانی ادامه یافت که تغییر وزن محسوسی در نمونه دیده نشد. سپس پتری‌دیش‌ها به درون دسیکاتور منتقل شده و پس از سرد شدن مجدداً توزین گردیده و میزان رطوبت محاسبه گردید. اندازه‌گیری پروتئین به روش کلدال و چربی به روش سوکسله با استفاده از حلال کلروفورم با نقطه جوش ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت انجام گرفت. خاکستر با سوزاندن لاشه در کوره الکتریکی ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت اندازه‌گیری شد. برای سنجش آنزیم‌های گوارشی، ابتدا ۹ قطعه ماهی از هر تیمار (۳ ماهی از هر تکرار) به طور تصادفی صید و پس از انتقال به آزمایشگاه، پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، با استفاده از روش (Safari and Paoluccii, 2017; Mohammadi Arani et al., 2019) انجام شد. فعالیت آنزیم آمیلاز با استفاده از نشاسته به عنوان سوبسترا با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Coccia et al., 2011).

فعالیت آنزیم لیپاز در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با استفاده از α - caprylate naphthyl به عنوان سوبسترا سنجیده شد (Lopez-López et al., 2003). فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از azocasein در طول موج ۳۶۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از diethanolamine و p-nitrophenyl phosphate به عنوان سوبسترا در طول موج ۴۰۵ نانومتر بررسی شد (Gimenez et al., 2001). در مطالعه حاضر، آنزیم‌های گوارشی مذکور بر اساس واحد آنزیم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) محاسبه شدند و از روده هر ماهی به طور جداگانه برای سنجش‌ها استفاده گردید.

این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی تحت ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2010 استفاده شد. جهت اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-wilk استفاده شد و در صورت نرمال بودن، توزیع داده‌های مورد بررسی، با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد، ابتدا اختلاف کلی بین میانگین‌ها مشخص و سپس با آزمون دانکن، گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $P < ۰/۰۵$ درنظرگرفته شد.

٤. نتایج

در بررسی عملکرد رشد، بر اساس جدول ۱، مشاهده شد که بیش‌ترین میزان وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه مربوط به جیره شش و هفت بود که با جیره شاهد اختلاف معنادار داشت ($P<۰/۰۵$)؛ با این وجود در طول نهایی ماهیان در پایان دوره هیچ اختلاف معناداری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). افزون بر این‌ها، بیش‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های غذایی آزمایشی شش و هفت مشاهده گردید که اختلاف معنادار بین آن‌ها وجود داشت ($P<۰/۰۵$).

در بررسی کشت میکروبی، بر اساس نتایج شکل ۱، مشخص شد که در انتهای دوره تعداد کل کلنی باکتری‌های بومی روده و تعداد کل کلنی باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی زبرای تغذیه شده با جیره مکمل‌سازی شده با عصاره قارچ دکمه‌ای به تنهایی و در ترکیب با پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس

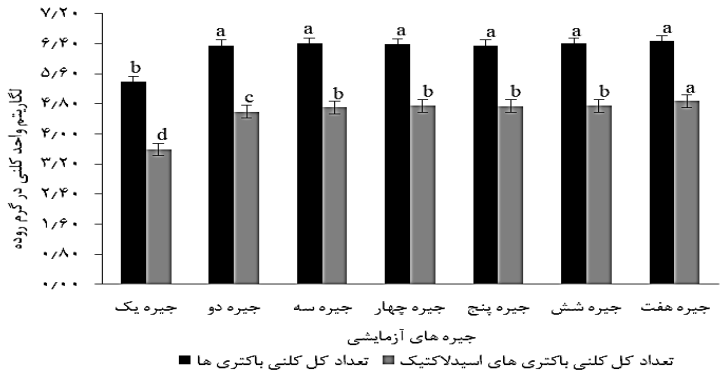
اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). اما، ده روز پس از توقف غذادهی با جیره‌های غذایی حاوی افزودنی‌ها، تعداد کل کلنی باکتری‌های بومی روده و تعداد کل کلنی باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی زبرا در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($P>۰/۰۵$) (شکل۲).

جدول ۱- برخی از شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی متفاوت در مدت ۶۰ روز.

Table 1. Growth performance of zebrafish (*D. rerio*) fed with different supplementation diets for 60 days.

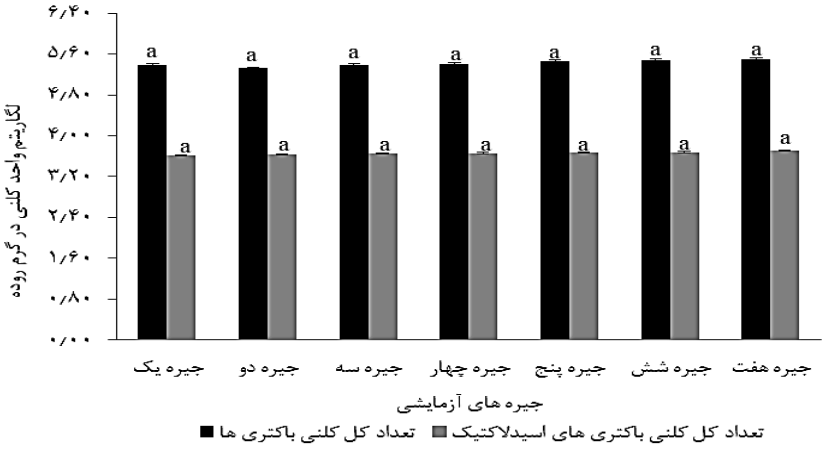
	جیره یک	جیره دو	جیره سه	جیره چهار	جیره پنج	جیره شش	جیره هفت
وزن اولیه (میلی‌گرم)	۷۷/۱±۴/۱^{a}	۷۶/۰±۵/۹^{a}	۷۵/۱±۶/۰^{a}	۷۴/۰±۹/۹^{a}	۷۶/۰±۷/۵^{a}	۷۴/۰±۹/۷^{a}	۷۵/۱±۳/۰^{a}
وزن نهایی (میلی‌گرم)	۱۸۰/۲±۷/۶^{c}	۲۰۱/۲±۸/۴^{b}	۱۸۱/۲±۷/۵^{c}	۲۰۰/۳±۶/۰^{b}	۱۸۲/۳±۴/۶^{c}	۲۲۲/۳±۲/۷^{a}	۲۲۰/۳±۳/۰^{a}
طول اولیه (میلی‌متر)	۱/۰±۶/۳^{a}	۱/۰±۷/۶^{a}	۱/۰±۷/۶^{a}	۱/۰±۶/۴^{a}	۱/۰±۷/۶^{a}	۱/۰±۶/۴^{a}	۱/۰±۶/۶^{a}
طول نهایی (میلی‌متر)	۳۷/۰±۳/۷^{a}	۳۷/۰±۷/۹^{a}	۳۷/۰±۰/۶^{a}	۳۸/۰±۰/۶^{a}	۳۷/۰±۳/۹^{a}	۳۹/۰±۰/۶^{a}	۳۹/۰±۳/۹^{a}
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	۱۳۳/۶±۹/۷^{c}	۱۶۳/۶±۹/۲^{b}	۱۴۰/۴±۴/۴^{c}	۱۶۸/۲±۰/۹^{b}	۱۳۷/۵±۸/۴^{c}	۱۹۶/۲±۸/۱^{a}	۱۹۲/۷±۸/۷^{a}
نرخ رشد ویژه (درصد وزنی/ روز)	۱/۰±۴/۱^{c}	۱/۰±۶/۰^{b}	۱/۰±۶/۰^{c}	۱/۰±۵/۱^{b}	۱/۰±۴/۰^{c}	۱/۰±۸/۰^{a}	۱/۰±۸/۱^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۰±۳/۱^{a}	۱/۰±۸/۱^{b}	۲/۰±۱/۰^{a}	۱/۰±۸/۰^{b}	۲/۰±۲/۱^{a}	۱/۰±۵/۰^{c}	۱/۰±۶/۱^{c}
درصد بازماندگی (٪)	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}	۱۰۰/۰±۰/۰^{a}

اعداد (میانگین±خطای استاندارد) در یک ردیف با حروف متفاوت، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P<۰/۰۵$). (جیره یک: جیره پایه یا شاهد، جیره دو: ۱ ٪ پربیوتیک، جیره سه: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، جیره چهار: لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، جیره پنج: لاکتوباسیلوس اسیدوغیلوس به همراه ۱٪ پربیوتیک، جیره شش: لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به همراه ۱٪ پربیوتیک، جیره هفت: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس به همراه ۱٪ پربیوتیک).



شکل ۱- لگاریتم تعداد کل کلنی باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی زبرای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی متفاوت (پس از پایان ۶۰ روز). اعداد (میانگین±خطای استاندارد) در یک ردیف با حروف مشابه، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (P>۰/۰۵).

Fig. 1- The effect of feeding experimental diets on the total viable and lactic acid bacteria counts in the gut of zebra fish (*D. rerio*) for 60 days.



شکل۲- لگاریتم تعداد کل کلنی باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی زبرای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی متفاوت (۱۰ روز پس از پایان دوره). اعداد (میانگین±خطای استاندارد) در یک ردیف با حروف مشابه، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (P>۰/۰۵).

Fig. 2- The effect of feeding experimental diets on the total viable and lactic acid bacteria counts in the gut of zebra fish (D. rerio) 10 days after stopping supplementations.

در بررسی ترکیب لاشه، با توجه به نتایج مندرج در جدول ۲، مشاهده گردید که افزودن مکمل‌های غذایی سبب ایجاد تغییرات قابل توجهی در ترکیب بدن نشد؛ با این وجود، میزان پروتئین و چربی بدن در تیمار تغذیه شده با جیره هفت (جیره حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و قارچ دکمه‌ای) در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنادار وجود داشت ($P<0/05$)، اما، در میزان خاکستر و رطوبت تمامی تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی اختلاف معنادار مشاهده نشد ($P>0/05$).

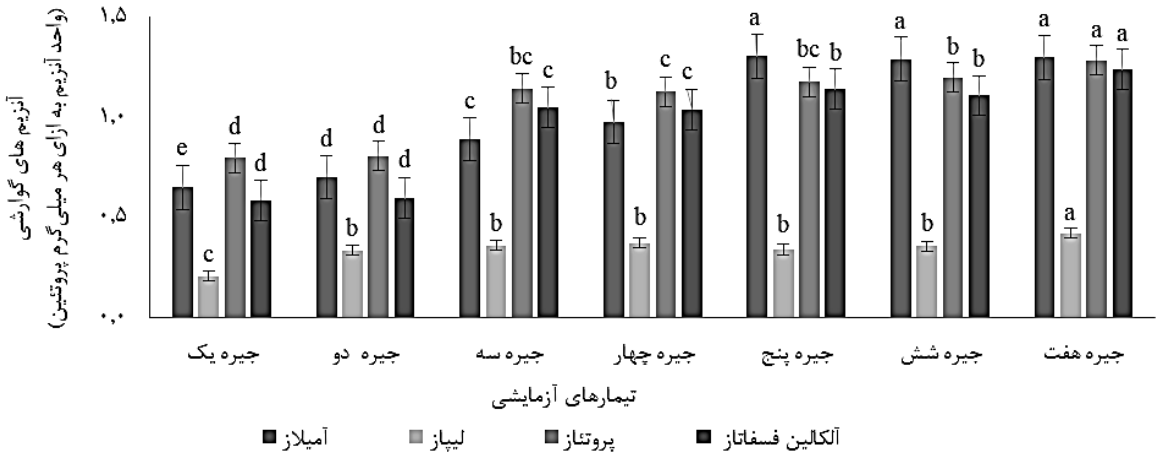
در بررسی آنزیم‌های گوارشی، با توجه به نتایج شکل ۳ مشخص شد که افزودن مکمل‌های غذایی سبب ایجاد تغییرات قابل توجهی در میزان آنزیم‌های گوارشی در تیمار تغذیه شده با جیره هفت در مقایسه با تیمار شاهد شد که دارای اختلاف معنادار بود ($P<0/05$)، اما، این تغییرات در بین سایر تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی معنادار نبود ($P>0/05$)؛ اگرچه، این تغییرات در مقایسه با تیمار شاهد در برخی موارد معنادار بود ($P<0/05$).

جدول ۲. ترکیب بدن ماهی زبرای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی متفاوت به مدت ۶۰ روز

Table 2. Body composition of zebrafish (*D. rerio*) fed with different experimental diets for 60 days.

	جیره یک	جیره دو	جیره سه	جیره چهار	جیره پنج	جیره شش	جیره هفت
پروتئین (%)	^{c}۵۸/۲۴±۰/۶۱	^{bc}۵۹/۳۸±۰/۱۸	^{bc}۵۸/۹۷±۰/۲۱	^{b}۶۰/۰۹±۰/۵۵	^{bc}۵۹/۷۶±۰/۱۷	^{b}۶۳/۷۷±۰/۸۶	^{a}۶۴/۴۷±۰/۳۳
چربی (%)	^{a}۱۰/۲۹±۰/۰۸	^{a}۱۰/۲۸±۰/۰۸	^{a}۱۰/۲۷±۰/۱۰	^{a}۱۰/۳۱±۰/۰۶	^{a}۱۰/۴۰±۰/۰۹	^{a}۱۰/۴۷±۰/۱۱	^{a}۱۰/۴۱±۰/۰۸
خاکستر (%)	^{a}۲/۲۷±۰/۰۷	^{a}۲/۲۲±۰/۰۳	^{a}۲/۲۰±۰/۰۵	^{a}۲/۲۱±۰/۰۴	^{a}۲/۲۳±۰/۰۴	^{a}۲/۳۱±۰/۰۱	^{a}۲/۲۲±۰/۰۴
رطوبت (%)	^{a}۷۰/۳۵±۰/۱۴	^{a}۷۰/۳۳±۰/۱۴	^{a}۷۰/۲۷±۰/۱۴	^{a}۷۰/۵۰±۰/۱۱	^{a}۷۰/۳۹±۰/۱۱	^{a}۷۰/۲۸±۰/۱۵	^{a}۷۰/۳۲±۰/۱۳

اعداد (میانگین±خطای استاندارد) در یک ردیف با حروف مشابه، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است(P>۰/۰۵).



شکل ۳- تغییرات آنزیم‌های گوارشی در ماهی زبرای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی متفاوت حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی در جیره‌های متفاوت است (P<۰/۰۵).

Fig. 3- Changes in digestive enzymes in Zebrafish (D. rerio) fed with different experimental diets for 60 days.

٤.بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، نتایج این بررسی نشان داد افزودن توام باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*) به عنوان پروبیوتیک و عصاره قارچ دکمه‌ای به عنوان پربیوتیک به جیره ماهی زبرا به صورت یک ترکیب سین‌بیوتیک اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد این ماهی داشت که در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معادار بود. این در حالیست که استفاده از آن‌ها به صورت جداگانه دارای اثرات کم‌تر بوده است، ولی با این حال، نسبت به تیمار شاهد افزایش رشد مشاهده شد. اگرچه، در تیمار تغذیه شده با جیره سه و پنج اختلاف معناداری با گروه شاهد وجود نداشت، که ممکن است به این دلیل باشد که در اثر رقابت با سایر باکتری‌های فلور روده، گزینش انتخابی پربیوتیک توسط باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تغییر کرده باشد. هم‌جنین، اگر یک باکتری جزو فلور طبیعی روده باشد، افزودن آن به عنوان افزودنی تاثیر خاصی نمی‌گذارد؛ چرا که، این باکتری به طور طبیعی در فلور روده ماهی فعالیت دارد (Fuller, 1992). نتایج این تحقیق حاکی از وجود اثر هم‌افزایی بین پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک استفاده شده در جیره غذایی ماهی زبرا بود؛ اگرچه، تاکنون گزارشی در زمینه استفاده از پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و عصاره حاصل از قارچ خوراکی با خاصیت پربیوتیکی به عنوان ترکیب سین‌بیوتیکی در آبزی‌پروری ارائه نشده است، ولی نتایج به دست آمده در این مطالعه هم‌راستا با برخی از گزارش‌های پیشین در خصوص استفاده از سین بیوتیک‌هاست (Rodriguez-Estrada et al., 2009; Geng et al., 2011; Ye et al., 2011; Mehrabi et al., 2012). در مطالعه دیگری که روی ماهی زبرا انجام شده بود، بررسی خواص سین‌بیوتیکی (بیومین‌ایمبو) بین پروبیوتیک *انتروکوکوس فاسیوم* با پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید نتایج مشابهی به دست آمد (Nekoubin et al., 2012). این نتایج مشخص می‌کند تحت شرایط آزمایشگاهی در ماهی زبرا بین این دو مکمل خواص سین‌بیوتیکی وجود داشت؛ اگرچه، در مطالعه حاضر چنین روندی در خصوص استفاده مجزا از دو جنس لاکتوباسیلوس و عصاره قارچ خوراکی نیز مشاهده شد، با این وجود نمی‌توان به طور قطعی گفت که دلیل انتخاب این پربیوتیک به عنوان سوبسترای رشد این دو جنس از لاکتوباسیل‌ها، ایجاد ترکیب بهینه و مطلق سین‌بیوتیکی در استفاده توأم بوده است؛ زیرا ممکن است نتایج به دست آمده با تغییر در نحوه عصاره‌گیری و تغییر pH روده تغییر کند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق مشاهده شد که میزان رشد و وزن‌گیری در تیمار تغذیه شده با جیره سه و پنج کم‌تر از سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد اختلاف معنادار نداشت؛ در حالی‌که، همین باکتری زمانی که با *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در جیره هفت استفاده شد به دلیل ایجاد اثر هم‌افزایی سبب افزایش بیش‌تر رشد در این تیمار گردید. احتمال می‌رود کارایی بهتر رشد تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به دلیل مناسب‌تر بودن شرایط روده از نظر pH برای رشد بهتر و افزایش بیش‌تر این گونه در مقایسه با باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* باشد؛ چرا که pH بهینه برای رشد حداکثری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بیش‌تر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بوده که با توجه به شرایط روده ممکن است توجیه شود؛ با این حال، اظهار نظر دقیق و قطعی برای فهم چرایی این اختلاف نیازمند پژوهش‌هایی در سطح مولکولی می‌باشد که انجام آن در روند

پژوهش حاضر امکان پذیر نبود. در تحقیق دیگری نیز که روی ماهی زبرا توسط(Fadai Rayati et al., 2017) انجام شد، مشخص گردید استفاده از پربیوتیک اینولین در جیره به طور معنی‌داری کارایی مصرف جیره و رشد را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. نتایج این مطالعه نیز موید نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است؛ که تیمار تغذیه شده با جیره دو که عصاره پربیوتیکی به میزان ۱٪ جیره اضافه شده بود، به طور معناداری دارای درصد افزایش وزن بیشتری در مقایسه با گروه شاهد بود. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تعداد کل کلنی‌های موجود در میکروبیوتای روده و باکتری‌های اسیدلاکتیک پس از پایان دوره در مقایسه با گروه شاهد افزایش چشم-گیری داشت و این در حالیست که ده روز پس از توقف افزودن مکمل-های غذایی این افزایش مشاهده نشد. مطالعات انجام شده روی این مکمل‌ها نشان داد که اثرات آن‌ها پس از توقف مصرف از بین رفته و پایدار نیست. هم‌چنین، میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده فلور طبیعی روده، به طور دائم در دستگاه گوارش قرار ندارند. علی‌رغم این که گمان می‌رود فلور میکروبی روده ثابت است، ثابت شده که ترکیب فلور دائما تغییر می‌کند (Sepehrfar et al., 2018). این تغییرات در سویه‌های میکروفلور روده موجودات نشان داد که اگر سویه مصرفی موفق شود در دستگاه گوارش استقرار یابد، این سویه فقط تا زمانی در آن محل باقی می‌ماند که قابلیت تطابق بیش‌تری برای استقرار در آن‌جا را داشته باشد (Brassart and Schiffrin, 2000). بر اساس مطالعات صورت گرفته پروبیوتیک‌ها احتمالا با تاثیر بر فلور میکروبی روده اعمال اثر می‌کنند. برخی از محققین اعتقاد دارند که اگر پروبیوتیکی در محیط طبیعی میزبان وجود داشته و توسط میزبان مصرف شود و جزو فلور روده گردد، در صورت معرفی آن در جیره به عنوان پروبیوتیک تاثیری بر میزبان نخواهد داشت؛ زیرا جزو فلور طبیعی روده میزبان است (Fuller, 1992). از سویی دیگر، خوراندن باکتری‌ها و یا سایر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی در مرحله کیسه زرده باعث استقرار فلور میکروبی اولیه در روده آن‌ها می‌شود. که این فلور میکروبی به صورت توالی تا زمان بلوغ جانور و استقرار و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش ادامه می‌یابد؛ بنابراین، برای ایجاد اختلاف در فلور میکروبی دستگاه گوارش بین تیمارهای مختلف این آزمایش، می-بایست بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات (Ringø and Gatesoupe, 1998) تغذیه با مکمل‌های میکروبی بلافاصله پس از تخمه‌گشایی به منظور اشغال و کلنی‌سازی روده لاروها قبل از معرفی غذای زنده انجام می‌گردید. همان‌طور که در ابتدا بیان گردید، نتایج این تحقیق نشان داد که جیره غذایی حاوی سین‌بیوتیک‌ها سبب افزایش وزن بدن شد. این نتایج کمک شایانی به تولیدکنندگان ماهیان زینتی خواهد کرد، چرا که رسیدن به اندازه و وزن مطلوب هدف نهایی تولیدکنندگان است که سبب کاهش هزینه‌های مربوطه می‌گردد. این نتایج مشابه نتایج حاصل از یافته‌های مشابه قبلی در سایر گونه‌های مورد مطالعه است (Ahmadi et al., 2014; Abedian Amiri et al., 2017). در تحقیق حاضر، ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل‌های میکروبی دارای بیشترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی بودند؛ همان‌طور که در نتایج حاصل از تحقیقات (Mohammadi Arani et al., 2019) در ارتباط با اثرات پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی زبرا مشاهده شد و نتایج به دست آمده با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت؛ این توانایی را می‌توان به ویژگی‌های خاص پروبیوتیک‌ها نسبت داد که آنزیم‌های گوارشی متفاوتی را تولید می‌کنند. این آنزیم‌ها شامل: آمیلاز، لیپاز، پروتئاز و آلکالین فسفاتاز می‌باشند که یا توسط باکتری‌ها در سیستم گوارشی میزبان تولید شده و یا با تحریک سیستم گوارشی میزبان سبب تولید این آنزیم از دستگاه گوارش می‌شوند (Eslamloo et al., 2012). از سویی دیگر، نتایج بهتر در عملکرد رشد در ماهیان به سبب افزایش در جذب مواد مغذی مانند: پروتئین و چربی است (Carnevali et al., 2006; El-Haroun et al., 2006). در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و درصد پروتئین بدن در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان هم‌راستا می‌باشد (Carnevali et al., 2017; Ferguson et al., 2010). بنابراین، می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی به سبب بهبود در قدرت پروبیوتیک‌ها و تحریک دستگاه گوارش ماهی بود که با اعمال اثرات مثبت بر افزایش جذب و هضم مواد مغذی در روده، افزایش رشد و افزایش میزان پروتئین را به دنبال داشت (Mohammadi Arani et al., 2019). با توجه به بررسی‌های انجام شده در تحقیق حاضر، مشخص گردید که استفاده از سین‌بیوتیک‌های حاوی باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس به میزان 10^7 سلول بر گرم جیره و عصاره قارچ دکمه‌ای به میزان ۱ درصد جیره ماهی زبرا که یکی از مهم‌ترین آبزیان و بهترین مدل حیوانی و مناسب جهت انجام مطالعات آزمایشگاهی و کارهای تحقیقاتی محسوب می‌شود، می‌تواند از طریق افزایش رشد و بازماندگی و ارتقاء سلامتی، سبب بهبود شاخص‌های رشد، ترکیب بدن، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و بهبود میکروبیوتای روده گردد

Refrences:

ABD RAHMAN, J.M.D., Razak, S.A. and Sabaratnam, V., 2012. Effect of mushroom supplementation as a prebiotic compound in super worm based diet on growth performance of red tilapia fingerlings. *Sains Malaysiana*, *41*(10), pp.1197-1203.

Abedian Amiri, A., Azari Takami, GH., Afsharnasab, M. and Razavilar, V. 2017. The comparative effects of dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium* on feed utilization, various health-related characteristics and yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum, 1972). *Iranian Fisheries Science*, *16*(2), pp. 753–773. (In Persian)

Agh, N., Irani, A., Noori, F. and Tookmehchi, A. 2019. Survey of *Lactobacillus delbrueckii* effects on Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in different life stages. *Journal of Journal of Fisheries Science and Technology*, *8*(1), pp. 1-8. (In Persian)

Ahmadi, S., Soltani, M., Shamsaie, M., Rajabi, M., Islami, H. and Peyghan, R. 2014. Comparative effect of *Pediococcus acidilactici* as probiotic and vitamin C on survival, growth performance and enzyme activities of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Animal Veterinary advances*, *13*(14), pp. 877–885.

Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H. and Zhang, L., 2006. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, Pseudosciaena crocea. *Aquaculture*, *260*(1-4), pp.255-263.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. II, 15th ed. Sec.985.29. The Association: Arlington, VA.

Bekcan, S., Dogankaya, L. and Cakirogullari, G.C., 2006. Growth and body composition of European catfish (Silurus glanis L.) fed diets containing different percentages of protein.

Brassart, D. and Schiffrin, E.J. 2000. Pre-and probiotics. *Essentials of functional foods*. 205-216.

Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (Dicentrarchus labrax, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, *258*(1-4), pp.430-438.

Carnevali, O., Maradonna, F. and Gioacchini, G., 2017. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: the role of probiotic. *Aquaculture*, *472*, pp.144-155.

Chen, S., Oh, S.R., Phung, S., Hur, G., Ye, J.J., Kwok, S.L., Shrode, G.E., Belury, M., Adams, L.S. and Williams, D., 2006. Anti-aromatase activity of phytochemicals in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Cancer research*, *66*(24), pp.12026-12034.

Coccia, E., Varricchio, E. and Paolucci, M., 2011. Digestive enzymes in the crayfish Cherax albidus: polymorphism and partial characterization. *International Journal of Zoology*, *2011*.

Del Signore, A., Romeo, F. and Giaccio, M., 1997. Content of phenolic substances in basidiomycetes. *Mycological Research*, *101*(5), pp.552-556.

El-Haroun, E.R., Goda, A.S. and Kabir Chowdhury, M.A., 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia Oreochromis niloticus (L.). *Aquaculture research*, *37*(14), pp.1473-1480.

Eslamloo, K., Falahatkar, B. and Yokoyama, S., 2012. Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon Acipenser baeri. *Fish & shellfish immunology*, *32*(6), pp.976-985.

Fadai Rayati, M., Ahmadifar, E. and Enayat golampour, T. 2017. Inulin Prebiotic effects of diet on Growth indicators, body weight gain and survival rate in Zebrafish (*Danio rerio*). *Iranian Journal of Veterinary Research*, *30*(2), pp. 194-202. (In persian)

Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcàzar, J.L. and Davies, S.J., 2010. The effect

of Pediococcus acidilactici on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (Oreochromis niloticus). *Journal of applied microbiology*, *109*(3), pp.851-862.

Fuller, R. 1992. Problems and prospects. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics. The Scientific basis. *Chapman and Hall*, London, UK, 377-386.

Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. and Liu, X.Q., 2011. Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, Rachycentron canadum. *Fish & shellfish immunology*, *31*(3), pp.400-406.

Ghasi saravard, S., Golestan, L. and Kabusi, H. 2014. Investigating the effect of button mushroom oral polysaccharide on bacterial growth of *lactobacillus acidophilus* in probiotic yogurt during cold storage. 22thd National Congress of Food Science and Technology, Sep 8-9 2014, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, 4 p. (In persian)

Ghobadi, Sh., Razeghi Mansour, M., Akrami, R., Amani Denji, K. and Esmaeili Mola, A. 2011. The effect of different levels of mananoligosaccharide on growth indices, survival, body composition and intestinal lactobacilli density in juvenile beluga (*Huso huso*, Linnaeus,1754). *Journal of Marine Science and Technology*, *10* (4), pp. 67-77. (In Persian)

Gibson, L.F., Woodworth, J. and George, A.M., 1998. Probiotic activity of Aeromonas media on the Pacific oyster, Crassostrea gigas, when challenged with Vibrio tubiashii. *Aquaculture*, *169*(1-2), pp.111-120.

Gimenez, A.F., Garcıa-Carreno, F.L., Del Toro, M.N. and Fenucci, J.L., 2001. Digestive proteinases of red shrimp Pleoticus muelleri (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *130*(3), pp.331-338.

Hevrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M. and Hemre, G.I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (Salmo salar L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, *11*(4), pp.301-313.

Hoseinifar, SH., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H.A., Poor Amini, M. and Darvish Bastami, K. 2011. The probiotic effects of dietary inactive yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on growth factors, survival, body composition and intestinal microbiota of Beluga juvenile (*Huso huso*). *Iranian Fisheries Science*, *19*(4), pp. 55-66. (In Persian)

Hoseinifar, SH. 2013. Investigation of the kinetics properties of some oligosaccharide probiotics with *Pediococcus acidilactici* probiotics and the selected synobiotic effects on intestinal microbiota, non-specific safety indicators, intestinal histomorphism and resistance *to Streptococcnus sp* in *Oncorhynchus mykiss*. *PhD Thesis*, Faculty of Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Iran.173 p. (In persian)

Hoseinifar, SH., Mirvaghefi, A., Amoozegar, A., Merrifield, D. and Ringo, E. 2017. *In vitro* selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, *23*, pp. 111-118. (In Persian)

Ijabadeniyi, A.O., 2007. Microorganisms associated with ogi traditionally produced from three varieties of maize. *Research Journal of Microbiology*, *2*(3), pp.247-253.

Imase, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H. and Takahashi, S.I., 2005. Lactobacillus reuteri Tablets Can Suppress Helicobacter pylori Infection: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Cross-Over Clinical Study: 98. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, *100*, pp.S55-S56.

Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H. and Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, *197*(1-4), pp.25-42.

Jeong, S.Y., Kang, S., Hua, C.S., Ting, Z. and Park, S., 2017. Synbiotic effects of β-glucans from cauliflower mushroom and Lactobacillus fermentum on metabolic changes and gut microbiome in estrogen-deficient rats. *Genes & nutrition*, *12*, pp.1-12.

Kedia, G., Wang, R., Patel, H. and Pandiella, S.S., 2007. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochemistry*, *42*(1), pp.65-70.

López-López, S., Nolasco, H. and Vega-Villasante, F., 2003. Characterization of digestive gland esterase–lipase activity of juvenile redclaw

crayfish Cherax quadricarinatus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *135*(2), pp.337-347.

Loponen, J., Laine, P., Sontag-Strohm, T. and Salovaara, H., 2007. Behaviour of oat globulins in lactic acid fermentation of oat bran. *European Food Research and Technology*, *225*, pp.105-110.

Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F. and Jafarpour, A. 2012. Effects of dietary supplimantation on growth, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal*, *96*(3), pp. 474-81.(In persian)

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Bøgwald, J., Castex, M. and Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, *302*(1-2), pp.1-18.

Mohammadi Arani, M., Salati, A.P., Safari, O. and Keyvanshokooh, S. 2019. Dietary supplementation effects of Pediococcus acidilactici as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (Danio rerio). *Aquaculture Nutrition, 25*(4), pp.854-861. (In persian)

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., Das, P., Paniprasad, K. and Mohanta, K.N., 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, Labeo rohita fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, *18*(1), pp.1-11.

Morshedi V., Nafisi Bahabadi M., Azodi M., Modaresi M. and Cheraghi S. 2016. Effects of dietary probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on body composition, serum biochemical parameters and liver enzymes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*, Bloch 1790). Journal of Marine Science and Technology. 14(2): 1-14.(In person)

Morshedi, V., Agh, N., Marmazi, J., Nouri, F. and Mohammadiyan, T. 2018. Effects of Single and Combined Supplementation of *Lactobacillus plantarum* with dietary xylooligosaccharide on growth performance, body composition and physiological responses of sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling. *Journal of Marine Science and Technology*, *17*(2), pp. 44-57. (In persian)

Nekoubin, H., Hatefi, S., Javahery, S. and Sudagar, M., 2012. Effects of synbiotic (Biomin Imbo) on growth performance, survival rate, reproductive parameters of angelfish (Pterophyllum scalare). *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, *9*(4), pp.327-332.

Nouri, F., Firouzbakhsh, F. and Soltani, M. 2010. Investigation of the effect of Protoxine probiotic on the growth and survival function of ornamental Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Renewable Natural Resources Research*, *1*(1), pp. 31-40. (In persian)

Paricheh, N., Jafaryan, H., Harsij, M., Ahmadi, A.R. and Sahandi, J. 2016. Effects of Bacillus probiotic enzyme extract on growth and carcass biochemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Journal of Marine Science and Technology*. *15*(3): 1-10. (In persian)

Pour Amini M. and Hoseinifar. SH. 2007. Application of probiotics and prebiotics in aquaculture. *Moje Sabz Publications*. 29-31. (In persian)

Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, *160*(3-4), pp.177-203.

Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, *137*(3), pp.830S-837S.

Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A. and Gibson, G.R., 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of nutrition*, *128*(1), pp.11-19.

Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. and Sweetman, J., 2009. Effects of single and combined supplementation of Enterococcus faecalis, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *Aquaculture Science*, *57*(4), pp.609-617.

Rurangwa, E., Laranja, J.L., Van Houdt, R., Delaedt, Y., Geraylou, Z., Van de Wiele, T., Van Loo, J., Van Craeyveld, V., Courtin, C.M., Delcour, J.A. and Ollevier, F., 2009. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. *Journal of applied microbiology*, *106*(3), pp.932-940.

Safari, R., Hoseinifar, SH., Nejadmoghadam, S. and Khalili, M. 2017. Non-specific immune parameters, immune, antioxidant and growth-

related genes expression of common carp (*Cyprinus carpio*) fed sodium propionate. *Aquaculture Research*. 1-9. (In Persian)

Safari, O. and Paoluccii, M. 2018. Effect of in vitro selected synbiotics galactooligosaccharide and mannanoligosaccharide with or *without Enterococcus faecalis* on growth performance, immune responses and intestinal microbiota of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz, 1823. *Aquaculture Nutrition. 24*, pp.247–259. (In Persian)

Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, M.Á., 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (Sparus aurata L.). *Fish & shellfish immunology*, *25*(1-2), pp.114-123.

Sepehrfar, D., Hoseinifar, SH. and Jafarnodeh, A. 2019. The effects of singular or combined administration of *Pediococcus acidlactii* and Rafinose as prebiotic on mucosal immune parameters and intestinal histomorphology ofCommon Carp (*Carassius auratus*). *Journal ofPhysiology and Animal Development*, *12*(1), pp. 25-34. (In persian)

Shi, Y.L., Benzie, I.F. and Buswell, J.A., 2002. Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, Agaricus bisporus. *Life sciences*, *70*(14), pp.1595-1608.

Tacon AGJ. 1990. Standard method for nutritional and feeding of farmed fish and shrimp. Argent librations press. 1: 117p.

Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K. and Koshio, S., 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder Paralichthys olivaceus to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science*, *72*, pp.310-321.

Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, *231*(1), pp.145-152.

Wooster, G.A., Bowser, P.R., Brown, S.B. and Fisher, J.P., 2000. Remediation of Cayuga Syndrome in landlocked Atlantic salmon Salmo salar using egg and sac-fry bath treatments of thiamine-hydrochloride. *Journal of the World Aquaculture Society*, *31*(2), pp.149-157.

Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D. and Sun, Y.Z., 2011. Single or combined effects of fructo-and mannan oligosaccharide supplements and Bacillus clausii on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder Paralichthys olivaceus. *Aquaculture nutrition*, *17*(4), pp.e902-e911.

Journal of Marine Science and Technology

Summer 2022, Vol. 21, No.2, pp. 63-75.

Available Online: ***http://jmst.kmsu.ac.ir***

Original Article

The effect of using synbiotics containing button mushroom (*Agaricus bisporus*) extract in combination with two species of lactic acid bacteria on digestive enzyme activities, body composition, growth and intestinal microbial flora in zebrafish (*Danio rerio*)

Hamideh Zakariaei [1], Mohammad Sudagar [*1], Seyedeh Sedighe Hoseini [2,3], Hamed Paknejad[1], Kartik Baruah [4]

1. Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, Gorgan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
3. Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences. Gorgan. Iran.
4. Department of Animal Nutrition and Management, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden.

*Corresponding Author E-mail: sudagar_m@gau.ac.ir

Received: 6 June 2020 **Revise Date:** 30 October 2022 **Accepted:** 1 November 2022

DOI: 10.22113/JMST.2020.233183.2375

Abstract

This study aimed to investigate the effect of two species of Lactobacillus probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus)* and button mushroom (*Agaricus bisporus*) extract singular and combined on digestive enzyme activities, body composition, survival, growth and microbial flora in Zebrafish (*Danio rerio*). For this purpose, 7 experimental diets were evaluated in 3 replications. One-month-old aged zebrafish (*D. rerio*) (75.9±1 mg) were fed with experimental diets including: diet without probiotics and prebiotic as the control diet (diet 1), diet with 1% button mushroom extract as prebiotic (diet 2), diet with 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus acidophilus* as probiotic (diet 3), diet with 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus bulgaricus* as probiotic (diet 4), diet with 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus acidophilus* in combination with 1% button mushroom extract as synbiotic1 (diet 5), diet with 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus bulgaricus* in combination with 1% button mushroom extract as synbiotic2 (diet 6) and diet with 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus acidophilus*, 10^7 CFU g^{-1} *Lactobacillus bulgaricus* and 1% button mushroom extract as synbiotic3 (diet 7) for 60 days. At the end of the experiment, Sampling was performed randomly to evaluate those mentioned factors. The results showed that the highest growth rate, specific growth rate and the lowest feed conversion ratio were observed in the synbiotic treatments, which were significantly different from the control group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the survival rate of all treatments with the control group ($P < 0.05$). Also, the highest activity of digestive enzymes was observed in the group which fed with diet 7, which was significantly different from other treatments and control group ($P < 0.05$). In addition, the highest amount of protein was observed in the treatment which fed with diet 7, which was significantly different from control group ($P < 0.05$). However, this difference in fat, ash content and body moisture between control group and other treatments was not significant ($P < 0.05$). The total number of intestinal microbial flora bacteria and lactic acid bacteria that was examined at the end of the period was significantly different from the control group in all treatments ($P < 0.05$). But, there was no significant difference between all treatments with the control group 10 days after stopping feeding with the experimental diets ($P < 0.05$). According to the results, feeding with synbiotics containing these probiotics in combination with button mushroom extract as a prebiotic had a positive effect on growth performance and digestive enzymes in Zebrafish (*D.rerio*), therefore, it can be recommended as a functional synbiotic in zebrafish (*D. rerio*) farming.

Keywords: Zebrafish, button mushroom, Lactobacillus bacteria, digestive enzyme.

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.