نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه‌ماهی صبیتی *(Sparidentex hasta)*

• **وحید مرشدی**
دانشجوی دکترای پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه و کارشناس پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
• **ناصر آق (نویسنده مسئول)**
دانشیار گروه شیلات پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران
• **جاسم مرمضی**
دانشیار پژوهشی پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، اهواز، ایران
• **فرزانه نوری**
استادیار گروه شیلات پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران
• **تکاور محمدیان**
استادیار گروه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: آذر ۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۴
Email: agh1960@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیبات بیوشیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه ماهی صبیتی *(Sparidentex hasta)* با میانگین وزنی ۰/۳ ± ۷/۶۴ گرم بود. این مطالعه در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار در تانک‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. ماهیان با جیره‌های حاوی ۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های لاشه و روده جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که لاکتوفرین جیره فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل پروتئاز، آمیلاز و لیپاز ماهی صبیتی را تغییر نداد ($p > ۰/۰۵$). در این آزمایش رابطه همبستگی ضعیف، مثبت و غیر معنی‌داری بین لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم پروتئاز، آمیلاز و لیپاز مشاهده شد ($p > ۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین تاثیری بر روی ترکیب بیوشیمیایی بدن شامل پروتئین، خاکستر و رطوبت و فلور باکتریایی روده ندارد ($p > ۰/۰۵$) ، اما میزان چربی لاشه در ماهیان تغذیه شده با ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($p < ۰/۰۵$). به طور کلی، این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی به وسیله لاکتوفرین جیره تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. علاوه بر این، می توان نتیجه‌گیری کرد که تغذیه ماهی صبیتی با جیره حاوی ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا برای یک دوره ۶ هفته ای ترکیب بیوشیمیایی بدن و فلور باکتریایی روده را بهبود نمی‌بخشد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بیوشیمیایی لاشه، فلور باکتریایی روده ، ماهی صبیتی

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 65-74

Effects of different levels of dietary lactoferrin on digestive enzymes, body composition and intestine bacterial flora of sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling

By: Morshedi, V., PhD student of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia and Researcher of Persian Gulf Institute, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran. Agh, N., (Corresponding Author) Associate professor of Department of Fisheries of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran. Marammazi, J., Associate professor of South Iranian Aquaculture Research Center, Ahwaz, Iran. Noori, F., Assistant professor of Department of Fisheries of Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran. and Mohamadian, T., Assistant professor of Department of Aquatic Health of Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University, Iran.

Received: November 2015 Accepted: January 2016

Email: agh1960@yahoo.com

The aim of this study was to determine the effects of dietary lactoferrin (LF) on digestive enzymes activity, body composition and intestine bacterial flora of sobaity (*Sparidentex hasta*) with an average weight of 7.64 ± 0.3 g. This study was carried out in a completely randomized design with three treatments and replications in fiberglass tanks with 300 liters volume. Fish were fed with feed containing 0, 400 and 800 mg lactoferrin per kg feed for 42 days. At the end of the experiment, body composition and intestine samples were collected. The obtained results indicated that dietary lactoferrin did not change sobaity digestive enzymes activity, including protease, amylse and lipase ($P > 0.05$). In this study, weak, positive and no significant correlation were observed between dietary lactoferrin and protease activity, amylase activity, and lipase activity ($P > 0.05$). The results indicated that different levels of lactoferrin did not affect body composition including protein, ash and moisture and intestine bacterial flora ($P > 0.05$) but fat content in fish fed on 400 mg lactoferrin per kg feed was significantly higher that control group ($P < 0.05$). Overall, this study showed that digestive enzymes activity was not affected by dietary lactoferrin. Moreover, it can be concluded that feeding of sobaity on the diet supplemented with 400 and 800 mg lactoferrin per kg feed for a period of 6 weeks do not improve the body composition and intestine bacterial flora.

Keyword: Lactoferrin, digestive enzymes, body composition, intestine bacterial flora, *Sparidentex hasta*

مقدمه

در حال حاضر با توجه به روند روزافزون جمعیت جهان و همچنین خشکسالی و بحران آب شیرین، تقاضا برای پرورش آبزیان دریایی و غذاهای دریایی افزایش یافته و به نظر می‌رسد یکی از مشکلات اساسی انسان، دستیابی به منابع پروتئینی متنوع و سالم باشد که آبزی‌پروری به عنوان یک راهکار اساسی، می‌تواند سهم زیادی از این تقاضا را تامین کند. علاوه بر این، تکثیر و پرورش آبزیان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود به طوری که کل تولید آبزی‌پروری در جهان در سال ۲۰۱۳ در حدود ۹۷/۲ میلیون تن بوده است که سهم آبزیان دریایی پرورشی ۵۲/۴ میلیون تن و سهم ماهیان دریایی پرورشی حدود ۵/۷ میلیون تن است (۱۳). یکی از راهکارهای بسیار مناسب جهت دستیابی به منابع غذایی با ارزش بالا، رونق دادن به صنعت آبزی پروری می‌باشد، ولی در کنار پیشرفت‌های سریع صنعت آبزی‌پروری و تولید متراکم آن، وجود بیماری در مزارع پرورشی غیرقابل انکار است. به منظور کنترل بیماری و درمان آن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسیناسیون در دهه‌های اخیر به طور کامل موثر واقع نشده است. بنابراین نیاز به روش‌های جایگزین از جمله استفاده از مکمل‌های غذایی برای افزایش عملکرد رشد و تغذیه و تحریک سیستم ایمنی احساس می‌شود (۲۸). انواع گسترده‌ای از ترکیبات برای این منظور استفاده می‌شوند که از آن جمله می‌توان به لاکتوفرین اشاره کرد.

لاکتوفرین (Lf) یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون که دارای جایگاه‌هایی برای پیوند با آهن است (۲۲). لاکتوفرین کارکردهای زیستی فراوانی از قبیل تنظیم جذب و انتقال آهن در روده (۳۶) ، بهبود فلور طبیعی روده (۳) و فعالیت‌های ضد باکتریایی (۲۱) دارد. در واقع، لاکتوفرین آهن آزاد محیط را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری‌ها و پاتوژن‌هایی که برای رشد و تکثیر خود به آن نیاز دارند از آن محروم می‌مانند و بدین ترتیب می‌تواند فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی روده را تحت تاثیر قرار دهد. لاکتوفرین مقاوم به حرارت بوده همچنین تا حدودی مقاوم به تجزیه پروتئولیتیک است که نشان دهنده این امر است که می‌تواند بر شرایط تولید غذا، مایعات اسیدی معده و پروتئولیتیک روده فائق آید. با توجه به این خصوصیات، تجویز خوراکی آن‌را که امکان تیمار توده‌ای ماهیان را داده و

با استرس‌های دســتکاری کمتری همراه است، فراهم می‌آورد (۲۲). مطالعه فعالیت آنزیمی به طورکلی نقش مهمی در جذب مواد مغذی و رشــد ماهیان دارد و می‌تواند بعضی از جنبه‌های فیزیولوژی تغذیه را روشن سازد و در رفع مشکلات تغذیه‌ای مفید واقع شود. در واقع آگاهی از نقش مکمل‌های غذایی بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشــی می‌تواند به عنوان یک ابزار مهم و موثر در ســاخت جیره‌های غذایی مناسب به کار گرفته شود. اگرچه اطلاعاتی که تاکنون در مورد ماهیان به دســت آمده نشان می‌دهد که عملکرد آنزیم‌های گوارشی از لحاظ کیفی مشابه مهره‌داران دیگر می‌باشد اما فرآیند گوارش در ماهیان کمتر از پســتانداران مطالعه شده است (۱۹). علاوه بر این، در مرور منابــع مطالعه‌ای که تاثیر لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشــی را مورد بررسی قرار باشد، یافت نشد.

با توجه به اهمیت یاد شده لاکتوفرین در بهبود فلور طبیعی روده، فعالیت‌های ضدباکتریایــی و افزایش تولید در صنعــت آبزی‌پروری و از طرفی با توجه به کارهای صورت گرفته در ســال‌های اخیر بر روی مولدسازی ماهی صبیتی و رســیدن به بیوتکنیک تکثیر و پروش این ماهی در کشور، چنین مکمل‌های غذایی در ماهی صبیتی مورد اســتفاده قرار نگرفته و باید بیشتر مورد توجه قــرار گیرد. بنابراین تحقیق حاضر به تعیین اثرات احتمالی ســطوح مختلف لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشــی، ترکیب بیوشــیمیایی لاشه و فلور باکتریایی روده بچه ماهیان صبیتی می‌پردازد.

مواد و روش کار

این تحقیق با همکاری پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور و در بخش تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی انجام شد. بچه ماهیان با وزن ۰/۳ ± ۷/۶۴ گرم از تکثیر بهار مولدین پرورشی مرکز مذکور تامین و در تانک‌های فایبرگلاس ۴۰۰۰ لیتــری در بخش تکثیر و پرورش این مرکز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه ســانتی‌گراد نگهداری شــدند. جهت انجام این آزمایش ۳ تیمار مختلــف غذایی با ۳ تکرار در نظر گرفته شــد. برای هر تکرار ۴۵ قطعه بچه ماهی صبیتی انتخاب و به صورت کاملا تصادفی در بین تانک‌های فایبرگلاس با ظرفیت ۳۰۰ لیتر (آبگیری تا ۲۵۰ لیتر) محتوی آب دریای فیلتر شــده و تیمار شده با اشــعه فرابنفش توزیع شدند. سپس ماهیان به مدت ۶ هفته با تیمارهای غذایی به شرح زیر تغذیه شدند.

۱. غذای کنسانتره فاقد لاکتوفرین (گروه شاهد)

۲. غذای کنســانتره حاوی ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۱)

۳. غذای کنســانتره حاوی ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۲)

از جیره غذایی تجاری (شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز) با اندازه ۲ میلی متر استفاده شــد (پروتئیــن ۴۱/۸±۰/۴۱، چربــی ۱۳/۹۲±۰/۲۲، رطوبت ۱۰±۰/۱۷، خاکســتر ۹/۲۳±۰/۱۲). لاکتوفریــن از شــرکت Biopole SA/NV بلژیک خریداری شد و پس از توزین مقدار مورد نیاز لاکتوفرین برای هر تیمار روی غذا اســپری شد. ســپس غلظت ۳ درصد ژلاتین نیز برای پوشش دار کردن غذا و جلوگیری از هدر رفت افزودنی‌ها بر روی آن اســپری شد. پس از آماده ســازی، غذا درون یخچال با دمای ۴ درجه ســانتی‌گراد نگهداری شــد تا از فساد آن جلوگیری گردد. غذادهی ماهیان روزانه در دو نوبت با فاصله زمانی مناســب (۱۶ و ۰۹) در حد ۴/۵ درصد وزن بدن انجام شد. شرایط محیطی شــامل دما (۲۷/۱±۰/۹) ، اکسیژن محلول (۶/۳ ± ۰/۵۵) ، شوری (۰/۵ ± ۴۸) و pH (۷/۵±۰/۱۵) در طول آزمایش برای تانک‌ها یکسان بود.

در پایــان آزمایش ۳ قطعه بچه ماهــی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و آسان‌کشــی شدند. بعد از خارج کردن امعاء و احشاء، لاشه ماهیان چرخ شده و تا زمان انجام آنالیزهای مربوطه (درصد رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) در دمای ۲۰- درجه ســانتی‌گراد نگهداری شدند. آنالیزهای تقریبی ترکیب بیوشــیمیایی جیره غذایی آزمایشی و لاشه با استفاده از روش‌های استاندارد AOAC (۵) و حداقل با ســه تکرار انجام شــد. میزان رطوبت بوسیله خشک کردن نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۵ °C به مدت ۲۴ ســاعت تا رســیدن به وزن ثابت تعیین گردید. خاکستر بوسیله سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ °C به مدت ۱۲ ســاعت محاســبه گردید. میزان پروتئین خام با ضرب محتــوای نیتروژن نمونه در ضریــب ۶/۲۵ و به روش کجلدال اندازه گیری و میزان چربی به روش سوکسله تعیین شد.

برای ســنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در روی یخ و تحت شــرایط استریل روده این ماهیان جدا و به فریزر ۸۰- درجه ســانتی‌گراد منتقل شــد. جهت اســتخراج عصاره آنزیمی، روده ماهی (گرم محتویات روده) را به نســبت ۵ : ۱ در بافــر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار توســط هموژنایزر (مدل Polytron PT ۱۳۰۰Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه هموژن شــده و ســپس هموژنات به مدت ۲۰ دقیقه در ســانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Z۳۶HK) در ۴ درجه ســانتی‌گراد با ســرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه ســانتریفوژ گردید و ســوپرناتانت حاصله در میکروتیوب‌ها جهت آنالیز آنزیم‌های مورد نظر تقسیم شده و تا زمان سنجش در دمای ۷۰- درجه ســانتی‌گراد نگهداری شد (۲۴). مقدار پروتئین محلول عصاره‌های آنزیمی با روش Bradford (۹) سنجش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از محلول سوبسترا آزوکازئین ۱/۵٪ در ۵۰ میلی مولار بافر Tris/Hcl در pH = ۷/۵ صورت پذیرفت (۱۴). فعالیت آنزیم لیپاز با اســتفاده از هیدرولیــز p-nitrophenylemyristate و به طریق اسپکتروفتومتری گردید (۲۰). فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش Bradford (۸) و با استفاده از سوبســترای نشاسته سنجش گردید. نشاسته تحت تأثیر آنزیم تجزیه شــده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد.

برای بررســی وضعیت میکروبی روده ماهیان، در پایان دوره از هر تیمار بطور مجزا نمونه‌برداری صــورت گرفت. برای این منظور بعد از حذف باکتری‌های سطحی بدن با الکل ۷۰ درصد، روده ماهیان جدا شده و بعد از هموژن شدند (۴). بعــد از تهیه رقت‌های مورد نظر با اســتفاده از ســرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد نمک) ، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت برروی پلیت حاوی محیط کشــت اختصاصی باکتری‌های اســید لاکتیک (MRS Agar) کشت داده شد. سپس پلیت‌های تهیه شــده برای هر تیمار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور قرارداده شدند. در نهایت باکتری‌های کشت شده براساس واحدCFU شمارش شدند (۲۶).

تجزیــه و تحلیل‌هــای آمــاری بــا اســتفاده از نــرم افــزار SPSS (۱۵,۱ version) تحت سیستم عاملWindows انجام گرفت. از آزمون Kol-mogrove-Smirnove به منظور بررســی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون لیون برای تعیین برابری واریانس‌ها و از آزمون همبســتگی پیرسون برای بررسی رابطه بین متغیرها استفاده شد. تفاوت‌های احتمالی بین تیمارها با استفاده از

آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey و Duncan بررسی شد. در همه آزمون‌های آماری سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

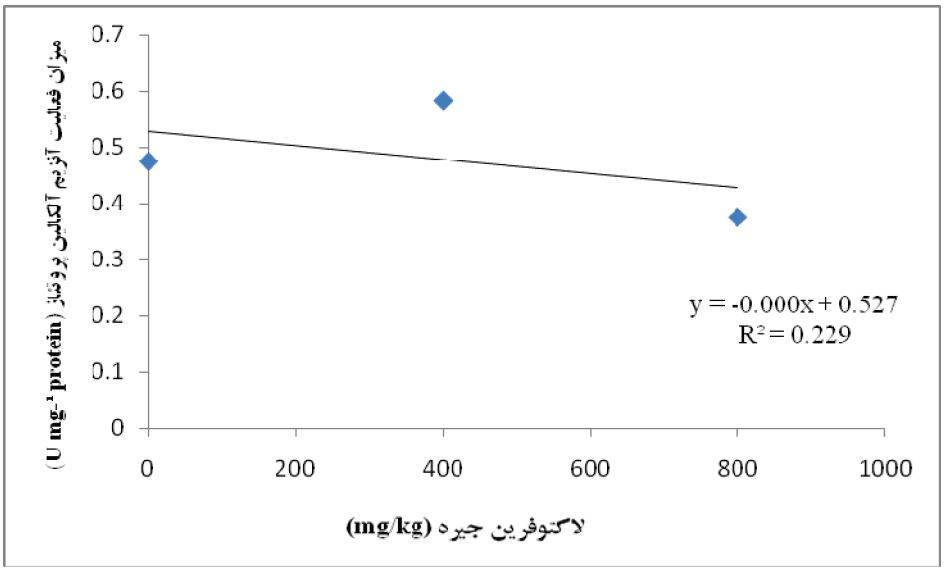
نتایج مربوط به بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در پایان آزمایش هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفرین و گروه شاهد نشان ندادند (p > ۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت پروتئاز و آمیلاز و لیپاز در تیمار ۱ گزارش شد. کمترین میزان فعالیت پروتئاز در تیمار ۲ و کمترین میزان فعالیت آمیلاز و لیپاز در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون همبستگی پیرسون در نمودار ۱ تا ۳ نشان داد که بین میزان فعالیت پروتئاز (R۲= ۰,۲۲۹) ، آمیلاز (R۲= ۰,۳۸۳) و لیپاز (R۲= ۰,۱۵۱) و مقدار لاکتوفرین جیره همبستگی ضعیف و مثبت وجود داشت. اما این همبستگی معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵).

اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین بر پارامترهای بیوشیمیایی لاشه در جدول ۲ و نمودار ۴ آورده شده است. میزان پروتئین، رطوبت و خاکستر لاشه اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد پربیوتیک نشان ندادند (P > ۰/۰۵). با این حال، میزان خاکستر لاشه اختلاف معنی‌داری را در پایان آزمایش بین تیمار ۱ و ۲ نشان داد (P > ۰/۰۵). میزان چربی لاشه در پایان آزمایش به صورت معنی‌داری در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین بالاتر از گروه شاهد مشاهده شد (P < ۰/۰۵). بیشترین میزان پروتئین و خاکستر لاشه در تیمار ۲ و کمترین میزان آن ها در تیمار ۲ وجود دارد. همچنین با افزایش میزان لاکتوفرین جیره در پایان آزمایش یک روند کاهشی در میزان رطوبت لاشه مشاهده شد. نتایج مربوط به فلور باکتریایی روده تیمارهای مختلف در جدول ۳ آمده است. تعداد باکترهای اسید لاکتیک و تعداد باکترهای کل اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین نشان ندادند (P > ۰/۰۵). بیشترین تعداد باکترهای اسید لاکتیک و باکترهای کل در گروه شاهد و کمترین تعداد آن‌ها در تیمار ۲ وجود دارد. همچنین با افزایش

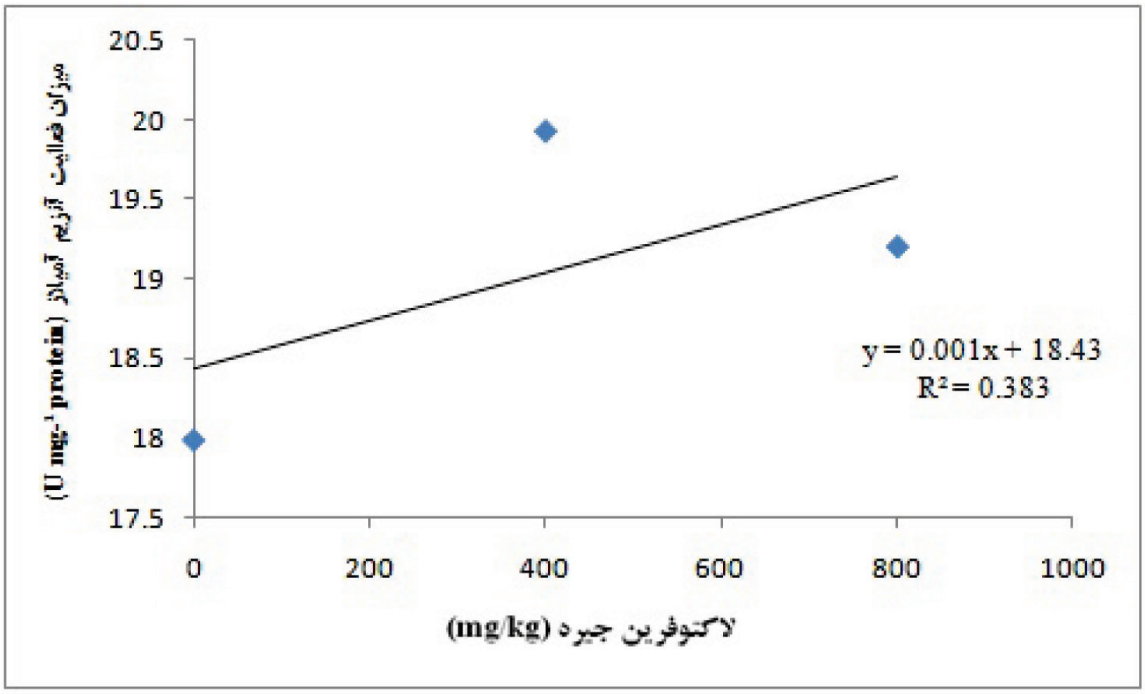
جدول ۱- فعالیت آنزیم های گوارشی بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
پروتئاز (U mg/protein)	۰/۴۷±۰/۰۵	۰/۵۸±۰/۱۷	۰/۳۷±۰/۰۹
آمیلاز (U mg/protein)	۱۷/۹۹±۱/۰۷	۱۹/۹۲±۱/۲۲	۱۹/۲۰±۱/۱۹
لیپاز (µmole/g/h)	۰/۰۱۷±۰/۰۰	۰/۰۲۹±۰/۰۰	۰/۰۲۲±۰/۰۰

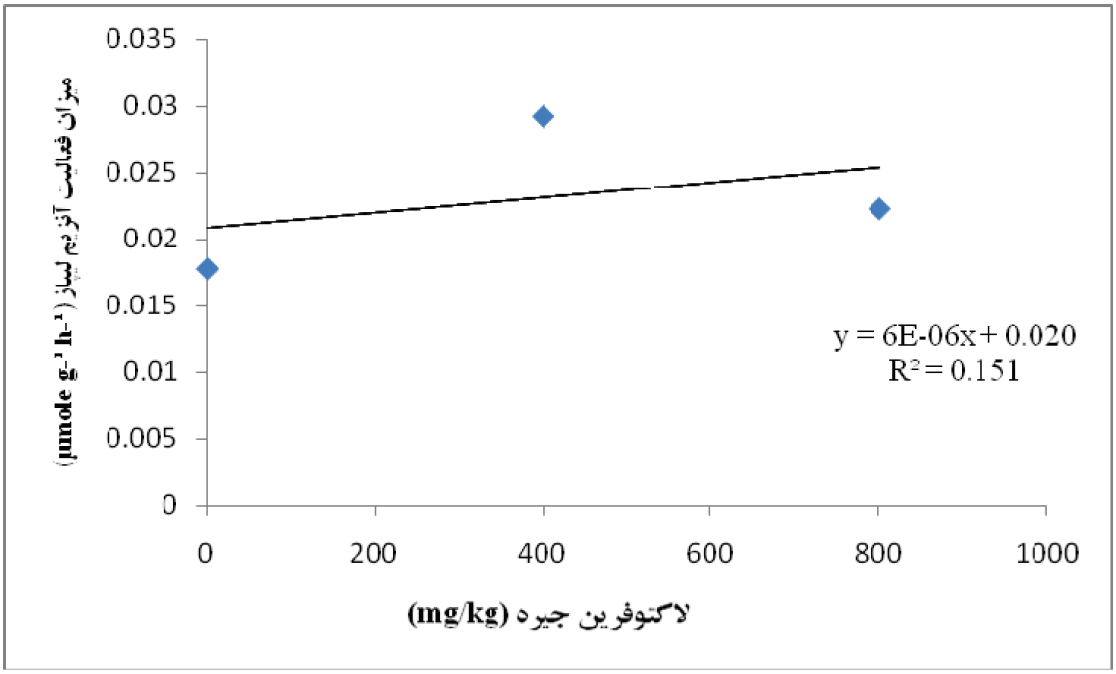
نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می باشد



نمودار ۱- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم پروتئاز بچه‌ماهیان صبیتی در پایان آزمایش



نمودار ۲- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم آمیلاز بچه‌ماهیان صبیتی در پایان آزمایش



نمودار ۳- رابطه همبستگی بین میزان لاکتوفرین جیره و فعالیت آنزیم لیپاز بچه‌ماهیان صبیتی در پایان آزمایش

جدول ۲: ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

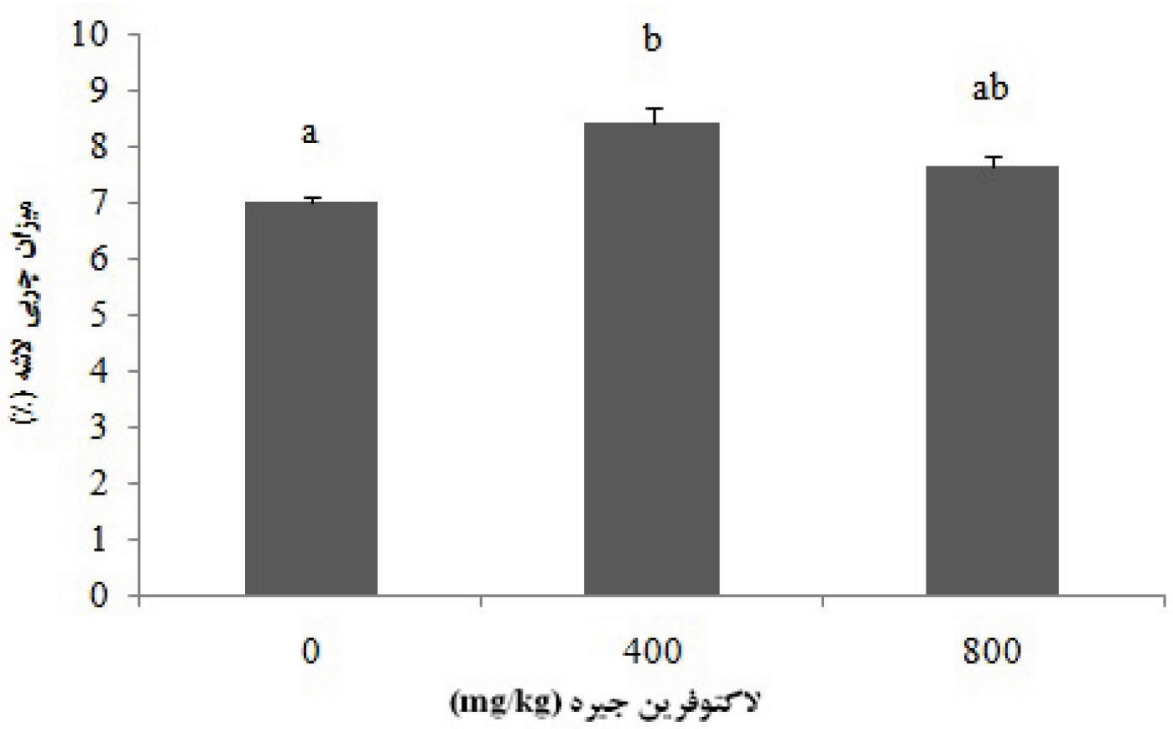
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
پروتئین (%)	۱۹/۹۹±۰/۱۷[a]	۱۹/۷۷±۰/۰۴[a]	۲۰/۳۴±۰/۳۲[a]
خاکستر (%)	۱۳/۱۵±۱/۱۳[ab]	۸/۱۸±۰/۱۵[b]	۱۷/۶۴±۰/۱۴[a]
رطوبت (%)	۶۶/۸۳±۰/۳۷[a]	۶۶/۷۵±۰/۱۳[a]	۶۵/۲۷±۰/۸۹[a]

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می‌باشد

جدول ۳- تعداد کلونی های باکتری (Log CFU/g) بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
تعداد باکترهای اسید لاکتیک	۳/۰۵±۰/۱۹	۲/۴۴±۰/۱۶	۲/۱۴±۰/۱۷
تعداد باکترهای کل	۲/۹۴±۰/۲۳	۲/۲۶±۰/۲۲	۲/۳۵±۰/۱۷

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد



نمودار ۴- تغییرات میزان چربی لاشه بچه ماهیان صبیتی تیمارهای مختلف در پایان آزمایش
مقادیری که با حروف متفاوت مشخص شده‌اند دارای اختلاف معنی‌دار می باشند ($P < 0/05$).

میـــزان لاکتوفریـــن جیره در پایـــان آزمایش یک روند کاهشـــی در تعداد باکترهای اسید لاکتیک مشاهده شد.

بحث

مطالعه آنزیم‌های گوارشـــی یک گام ضروری به ســـوی پی بردن به مکانیسم گوارش ماهی می‌باشـــد و نقش مهمی در هضم مواد غذایی برعهده داشته و آگاهی از ســـطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی ماهیان موثر باشـــد. از طرف دیگر، تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشـــی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشـــد (۳۳). چندین عملکرد زیستی به لاکتوفرین نســـبت داده شده که نقشهای فیزیولوژیک و مکانیسم آن هنوز نامشـــخص اســـت که از جمله آن می‌توان به نقـــش لاکتوفرین در فعالیت آنزیمی اشاره کرد (۱۰).

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از استفاده لاکتوفرین بر فعالیت آنزیم پروتئاز، آلفا آمیلاز و لیپاز نشـــان دهنده عـــدم وجود اختلاف معنی دار در تیمارهای تغذیه شـــده با لاکتوفرین و تیمار شاهد اســـت. با توجه به این که تحقیقات صـــورت گرفته بر روی اثرات لاکتوفرین جیـــره در ماهیان فعالیت آنزیم‌های گوارشی را مورد سنجش قرار نداده‌اند، مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته بر روی ســـایر محرک‌های ایمنی انجام می‌گیرد. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تیمارهای تغذیه شـــده با ارگوســـان اختلاف معنی‌داری را نســـبت به گروه شاهد نشـــان نداد، اما میزان فعالیت آنزیم لیپاز در ماهی قـــزل‌آلای رنگین کمان پس از تغذیه با ارگوســـان اختلاف معنی‌دار با گروه شـــاهد نشـــان داد (۱۷). در مطالعه Nya و Austin (۲۵) فعالیت آنزیم‌های گوارشـــی روده (پروتئاز کل، تریپســـین و آلکالین فسفاتاز) بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با محرک‌های ایمنی عصاره ســـیر، زنجبیل و لیپو پلی‌ساکارید مستخرج از دیواره باکتری به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه شـــاهد افزایش داشت. این محققین بیان کردند که سیستم گوارشی ماهیان می‌تواند به وســـیله عوامل خارجی از جمله تیمارهای غذایی تنظیم شود. قابل توجه است که سیستم گوارشی ماهیان توانایی پاسخ به مکمل‌های مختلف غذایـــی را دارد (۱۵). در مطالعه Bahram-Beigi (۷) گزارش شـــد که اســـتفاده همزمان و جـــدا از پروبیوتیـــک (*L. plantarum*) و پربیوتیک زایلوالیگوساکارید اختلاف معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به وجود نیاورد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم خوانی دارد. در تضاد با مطالعه حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشـــی به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک و پربیوتیک در تحقیقات مختلف گزارش شـــده اســـت. در تحقیقـــات Wang و Xu (۳۷) و Ye و همکاران (۳۹) به ترتیب با افزودن پروبیوتیک (*Bacillus sp.*) و ســـطوح ترکیبی پروبیوتیک (*Bacillus clausii*) و فروکتو و مانان اولیگوساکارید به جیره ماهی کپور و کفشک ماهی ژاپنی افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشـــی (پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) مشـــاهده شـــد. با توجه به عدم وجود همبســـتگی معنی‌دار بین میزان فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز و مقدار لاکتوفرین جیره، در مطالعه حاضر عدم وجود اختلاف معنـــی‌دار را می‌توان به کم بودن ســـطوح انتخابی لاکتوفرین جیره نســـبت داد. البتـــه عوامل زیادی بر نتایج متضاد به دســـت آمده از تحقیقات مختلف موثر می‌باشـــند که می‌توان به مواردی چون میزان انباشتگی روده، وضعیت تغذیه، پیچیدگی ساختار سوبسترا و ریتم‌های فیزیولوژیکی اشاره کرد (۲۳). علاوه بر این، شرایط آزمایشی متفاوت، روش‌های مختلف جمع‌آوری نمونه و سنجش آنزیم‌های گوارشی باعث اختلال در مقادیر آنزیم‌های مورد بررسی و مقایسه گونه‌های مختلف با هم می شود (۱۹).

تحقیقات نشـــان داده اســـت که ترکیبات بیوشیمیایی لاشـــه ماهیان تحت تاثیر چندیـــن عامل قرار می‌گیرنـــد که می‌توان به عوامل ریخت‌شناســـی، عوامل فیزیولوژیک و عوامل محیطی اشـــاره کرد (۲۹). در مورد تاثیر افزودن محرک‌های ایمنی به جیره روی کیفیت لاشه آبزیان مطالعاتی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر مشاهده شـــد که سطوح لاکتوفرین جیره تاثیری بر روی میزان پروتئین، رطوبت و خاکســـتر لاشـــه ماهیان ندارند. با این حال، در مطالعه حاضر میزان چربی لاشـــه بطور معنی‌داری در تیمار تغذیه شـــده با ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین نســـبت به گروه شاهد افزایش یافت. در همین راستا، میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر لاشه فیل ماهی و قزل‌آلا به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با ویتامین C ، ویتامین E و ارگوسان اختلاف معنی‌داری را نســـبت به گروه شـــاهد نشـــان نداد (۲۷،۱۷،۱۲). همچنین، Ahmadian (۲) تاثیر ســـطوح مختلف لاکتوفرین در جیره مولدین قزل آلای رنگیـــن کمان بر کیفیت تخم‌هـــای حاصله را مورد مطالعه قـــرار داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان چربی خام تخم‌ها بطور معنی‌داری در گروه‌های تغذیه شـــده با لاکتوفرین نســـبت به گروه شاهد افزایش یافته اســـت. میزان پروتئین خام تخم‌ها نیز در گروه تغذیه شده با ۲۰۰ میلی گرم لاکتوفرین بصورت معنی‌داری نســـبت به گروه شـــاهد و گروه تغذیه شده با ۱۰۰ میلی گرم لاکتوفرین افزایش پیدا کرد. همچنین El-Sayed Badawy و همکاران (۱۱) اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان چربی لاشه بین تیمارهای مختلف آزمایشـــی با گروه شاهد مشـــاهده کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. با استناد به مطالعه مذکور و تحقیق حاضر می‌توان بر این نکته تاکید کرد که ســـطوح مختلف لاکتوفرین جیره، میزان چربی لاشه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این امکان وجود دارد که لاکتوفرین با بهبودی ســـلامتی عمومی ماهیان و از طریق مکانیســـم‌هایی که فعلا برای ما شـــناخته شـــده نیســـتند می‌تواند در ذخیره‌سازی بیشتر پروتئین و چربی نقش داشته باشند و بدین‌ترتیب در تغییر کیفیت لاشه مؤثر باشد. با توجه به دو مطالعه صورت گرفته امکان قیاس نتایج مطالعه حاضر ممکن نمی‌باشد. لذا اظهار نظر قاطع در مورد این پارامترها به تحقیقات بیشـــتر نیاز دارد. به علاوه، این محققین اختلاف معنی‌داری را در استفاده از سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر میزان خاکســـتر و رطوبت لاشه ماهی تیلاپیای نیل گزارش نکردند که مشابه نتایج تحقیق حاضر بیانگر این مسئله اســـت که سطوح لاکتوفرین جیره نتوانسته اســـت اثرات زیادی بر روی کیفیت لاشـــه ماهیان بگذارد. برخی محققین بر این باورند که تغییرات در ترکیبات بیوشـــیمیایی لاشه ماهیان مانند محتوی پروتئین و چربـــی می‌تواند به تغییرات در ســـنتز پروتئین و چربی در بدن، میزان ذخیره شان در بافت‌های بدن و نرخ رشد متفاوت نسبت داد (۱۷،۱).

فلور میکروبی ماهیان شامل مجموعه‌ای از باکتری‌ها می‌باشد که نقش مهمی را در هضم غذا و کنترل بیماری‌ها بر عهده دارند. حضور باکتری‌های اســـید لاکتیـــک به عنوان باکتری‌هـــای دائم در اکوسیســـتم روده ماهیان از جمله ماهی کاد اقیانوســـی اطلـــس (*Gadus morhua*)، قـــزل آلای رنگین کمان (*Onchorhnchus mykiss*) و چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) ثابت شـــده اســـت اما جزء فلور غالب نیستند (۱۶). باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه تولید باکتریوســـین‌ها مانع از رشـــد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند و بدین ترتیـــب اثرات مثبتی بر میکرو فلور روده ماهـــی می‌گذارند (۲۶). از آنجا که

pH معده در ماهی بین ۳ تا ۴/۵ می‌باشد، و زمان بازماندگی غذا نسبتاً کوتاه است، این نکته عموماً پذیرفته شده است که باکتری‌هایی نظیر باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند در دستگاه گوارش زنده بمانند (۶).

در مطالعه حاضر فلور باکتریایی روده (کل باکترهای روده و باکتری‌های اسید لاکتیک) تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفرین اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد. به نظر می‌رسد که لاکتوفرین جیره نتوانسته است فلور باکتریایی روده را تغییر دهد و به عبارتی سطوح مختلف لاکتوفرین بر روی فلور باکتریایی تاثیرگذار نبوده است. متاسفانه، مطالعه‌ای که تاثیر لاکتوفرین را بر فلور باکتریایی روده ماهیان بررسی کرده باشد وجود ندارد. با این حال مطالعات صورت گرفته بر روی تاثیر استفاده از لاکتوفرین بر فلور باکتریی روده موش نشان می‌دهد که رشد باکتری‌های Clostridium *Escherichia coli* و Streptococcus به صورت معنی‌داری متوقف شد، اما بر رشد باکتری‌های Bifidobacterium موجود در روده تاثیری نداشت (۳۵). در مطالعه دیگر مشخص شده است که افزودن لاکتوفرین به جیره باکتری‌های Bifidobacterium موجود در روده موش را افزایش می‌دهد (۱۸). با توجه به این که اثرات لاکتوفرین بر فلور باکتریایی روده ماهیان مطالعه نشده است، امکان قیاس نتایج مطالعه حاضر ممکن نمی‌باشد. لذا اظهارنظر قاطع در مورد این پارامترها به تحقیقات بیشتر نیاز دارد.

بطور کلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهی صبیتی نداشت. ترکیب بیوشیمیایی بدن و فلور باکتریایی روده ماهیان نیز به صورت معنی‌داری تحت تاثیر لاکتوفرین جیره قرار نگرفت، با این حال، نتایج بدست آمده نشان داد که افزودن ۴۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به جیره میزان چربی لاشه را نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای مهندس نجف آبادی رئیس ایستگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی و سایر پرسنل محترم این مجموعه به جهت همکاری در مراحل عملی و آزمایشگاهی نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع مورد استفاده

1. Abdel-Tawwab M., Abdel-Rahman M. A., Nahla-Ismael E. M. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with Aeromonas hydrophila. *Aquaculture*, 280: 185–189.

2. Ahmadian E. (2012). Effects of different levels of dietary lactoferrin on egg quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. Thesis of Master of Science, Urmia University, 93 p (In Persian).

3. Al-Mashikhi ShA., Nahai Sh. (1987). Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration technique. *Journal of Dairy Science*, 70(12) : 2486-2492.

4. Andani H. R. R., Tukmechi A., Meshkini S., Sheikhzadeh N.(2012). Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 728–734.

5. AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists, 16th (end), *Procedure* 984. 25.

6. Askarian F., Matinfar A., Kousha A., Bahmani M., Khorshidi K., Shenavar A., Ringo E. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in the gastro intestinal tracts of reared Beluga (Huso huso) and Persian sturgeon (*Asipenser persicus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3(5) : 302-311.

7. Bahram Beigi M. (2013). Study of using synbiotic *Lactobacillus plantarum* probiotic andxylo oligosaccharidesprebiotic on growth indices, digestive enzymes activity, immune responses and environmental shocks in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis of Master of Science, Urmia University. 107 p (In Persian).

8. Bernfeld P. (1955). Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O (Eds) , Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Pp. 149-158.

9. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.

10. Brock J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 1-6.

11. El-Sayed Badawy T., Al-Kenawy D. (2013). Assessment of immune response supplemental immunoton and bovine lactoferrin as alternatives to antibiotics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 8(2) : 341-355.

12. Falahatkar B., Soltani M., Abtahi B., Kalbassi M. R., Pourkazemi M. (2006). Effects of dietary vitamin C supplementation on performance, tissue chemical composition and alkaline phosphatase activ-

ity in beluga sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 283-286.

13. FAO. (2015). FishStat Plus datasets. Fishery statistical collections: Aquaculture Production (1950–2013; released March 2015). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

14. Garcia-Carreno F. L., Haard N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in *Langostilla pleuroncodes* planipes and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17: 97-113.

15. Garcia-Carreno F. L., Albuquerque-Cavalcanti C., del Toro M. A. N., Zaniboni-Filho E. (2002). Digestive proteinase of Brycon orbignyanus (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology* B, 132: 343–352.

16. Hagi T., Tanaka D., Iwamura Y., Hoshino T. (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in intestinal tract of cultured fish. *Aquaculture*, 234: 335-346.

17. Heidarieh M., Mirvaghefi A. R., Akbari M., Farahmand H., Sheikhzadeh N., Shahbazfar A. A., Behgar M. (2012). Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1169–1174.

18. Hentges D. J., Marsh W. W., Petschow B. W., Thal W. R., Carter M. K. (1992). Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora-associated mice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14: 146–152.

19. Hidalgo M. C., Urea A., Sanz A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.

20. Iijima N., Tanaka S., Ota Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancrease of red sea bream Pagarus major. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 59-69.

21. Jenssen H., Hancock, B. R. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91: 19-29.

22. Kumari J., Swain T., Sahoo P. K. (2003). Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish, Clarias batrachus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94: 1-9.

23. Lopez-Vasquez K., Castro-Perez C. A., Val A. L. (2009). Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *Journal of Fish Biology*, 74: 1620-1628.

24. Moraiti-Ioannidou M., Castritsi-Catharios J., Miliou H. (2008). Biochemical composition and digestive enzyme activity during naupliar development of Artemia spp. from three solar saltworks in Greece. *Aquaculture*, 286: 259-265.

25. Nya E. J., Austin B. (2011). Dietary modulation of digestive enzymes by the administration of feed addetives to rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* Walbaum. Aquaculture Nutrition, 17: 495-466.

26. Ringo E., Gatesoupe F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.

27. Safarpour Amlashi A., Falahatkar B., Sattari M., Tolouei Gilani M. H. (2011). Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 807-814.

28. Sakai M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

29. Salam A., Davies P. M. C. (1994). Body composition of northern pike, *Esox lucius* L., in relation to body size and condition factor. *Journal of Fisheries Research*, 19: 193-204.

30. Skrodenyte-Arbaciauskiene V., Sruoga A., Butkauskas D., Skrupskelis K. (2008). Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. *Fisheries Science,* 74: 1307–1314.

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

32. Sun Y. Z., Yang H. L., Ma R. L., Song K., Li J. S. (2011). Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 165: 1-9.

33. Sunde J., Taranger G., Rungruangsak-Torrissen K. (2001). Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25: 335-345.

34. Suzer C., Çoban D., Kamaci H. O., Saka S., Firat K., Otgucuoğlu Ö. (2008). Lactobacillus spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280, 140-145.

35. Teraguchi S., Ozawa K., Yasuda S., Shin K., Fukuwatari Y., Shimamura S. (1994). The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrin on intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58: 482–487.

36. Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M. (2006). Lactoferrin

research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16: 1241-1251.

37. Wang Y. B., Xu Z. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 283-292.

38. Xu B., Wang Y., Li J., Lin Q. (2009). Effect of prebiotic xylo-oligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus* Gibelio). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 351–357.

39. Ye J. D., Wang K., Li F. D., 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: 902-911.