فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بهبود عملکرد رشد، فعالیت آنزیم گوارشی، شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با پروبیوتیک *Bacillus cereus*

طوبی حیدری صادق[۱]، احسان احمدی‌فر[۲]*، مریم دادار[۳]، نجمه شیخ‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: بهمن ۹۸ تاریخ پذیرش: فروردین ۹۹

چکیده

باکتری‌های جنس *Bacillus* به دلیل مقاومت بالا در شرایط محیطی نامناسب، از پروبیوتیک‌های رایج در آبزی‌پروری هستند. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات باکتری *Bacillus cereus* بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پایه‌ریزی شد. پس از دوره سازگاری ۱۴ روزه، ماهی‌ها با میانگین وزن ۷۰/۵۷±۰/۷۲ گرم در ۱۲ وان (۱۵ ماهی در هر وان) با جیره پایه (گروه شاهد) و جیره‌های حاوی پروبیوتیک *B. cereus* با مقادیر $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$ سلول در گرم تغذیه شدند. پس از ۴۵ روز تغذیه، جیره حاوی بالاترین مقدار پروبیوتیک سبب ایجاد پاسخ بهتر در افزایش وزن، آنزیم‌های گوارشی تریپسین، آمیلاز و لیپاز، تعداد گلبول سفید و لنفوسیت، آنتی‌بادی کل، فعالیت لیزوزیم و پروتئاز در مقایسه با جیره شاهد شد (P<۰/۰۵). همچنین، افزایش معنی‌دار آلبومین، تری‌گلیسرید و آسپارتات آمینوترانسفراز در مقادیر میانی و بالایی پروبیوتیک مشاهده شد (P<۰/۰۵). بر اساس این نتایج مصرف پروبیوتیک *B. cereus*، به ویژه به میزان $۱۰^{۹}$ سلول در گرم، برای بهبود عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی در ماهی کپور معمولی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: Bacillus cereus، *کپور معمولی، رشد، آنزیم گوارشی، شاخص‌های بیوشیمیایی، شاخص‌های ایمنی.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ایران.
۴- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

مقدمه

رشد فزاینده و روزافزون جمعیت جهان، تامین غذا و دستیابی به منابع جدید غذایی را به یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های دولت‌ها مبدل ساخته است. یکی از شرایط تولید آبزیان پرورشی حفظ بهداشت و جلوگیری از بروز بیماری‌های ماهیان از جمله بیماری‌های عفونی و غیرعفونی است (Cho and Lee, 2012). کنترل بیماری‌های ماهی با استفاده از مواد دارویی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی همچون افزایش مقاومت دارویی باکتری‌ها، نگرانی‌های مصرف‌کنندگان به دلیل باقی‌مانده‌های دارویی و نیز تاثیرات محیطی را در بردارد (Otatake et al., 2002). امروزه مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت یک معضل جهانی در امر درمان بیماری‌ها درآمده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با هدف کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، عوارض سویی بر فلور میکروبی مفید در جانوران آبزی بر جای می‌گذارد و همچنین آلودگی محیط زیست و مقاومت دارویی از دیگر اثرات سوء مصرف این ترکیبات شیمیایی است (Dawood et al., 2018).

پروبیوتیک‌ها سلول‌های زنده‌ای هستند که از طریق متعادل کردن فلور میکروبی دستگاه گوارش، بهبود مصرف غذا، مشارکت آنزیمی در هضم، بازدارندگی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ضد جهش و سرطان، ارتقای شاخص‌های رشد و تحریک سیستم ایمنی، تاثیرات مثبت بر سلامت میزبان دارند (Verschuere et al., 2000). امروزه پروبیوتیک‌ها بخش جدایی ناپذیر در فعالیت آبزی‌پروری شده‌اند که قادر به تقویت رشد، مقاومت در برابر بیماری و افزایش تولید در گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی هستند. در کل، پروبیوتیک‌ها از راه‌های مختلف مانند ترکیبات مهاری، رقابت بر سر ترکیبات مغذی و مکان چسبیدن و در نهایت با تحریک سیستم ایمنی قادر به مبارزه با عوامل بیماری‌زا هستند (Perez-Sanchez et al., 2014). برخی پروبیوتیک‌های تجاری مورد استفاده در آبزی‌پروری، استخراج شده از دستگاه گوارش موجودات خشکی‌زی هستند (Nayak, 2010). *Bacillus cereus* یک باکتری گرم مثبت، هوازی- بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل با آرایش زنجیره‌ای از خانواده Bacillaceae است (Evelyn and Silva, 2015). بیشتر سویه‌های *B. cereus* ساپروفیت هستند و انتشار وسیعی در طبیعت دارند که این ناشی از مقاومت اسپورها به استرس‌های گوناگون و بقای طولانی

آن‌ها در شرایط نامساعد است (Messaoudi et al., 2010). در مقابل، برخی سویه‌های این باکتری اثرات مفیدی را در انسان و جانوران نشان می‌دهند (De Souza et al., 2012). در گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی نیز اثرات مثبت این پروبیوتیک مشخص شده است (De Souza et al., 2012; Hao et al., 2014; NavinChandran et al., 2014; Zhao et al., 2016). به عنوان مثال، در لارو گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) افزایش مقاومت در برابر باکتری بیماری‌زای *Vibrio carchariae* پس از مصرف پروبیوتیک *B. cereus* دیده شد (De Souza et al., 2012). مصرف این باکتری در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) نیز سبب افزایش رشد، مقاومت و تقویت سیستم ایمنی شد (Hao et al., 2014). NavinChandran و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که *B. cereus* جدا شده از روده میگوی *Penaeus monodon* قادر به افزایش رشد و بهبود سیستم ایمنی در میگوهای پرورشی است. همچنین Zhao و همکاران (۲۰۱۶) تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت علیه *Vibrio splendidus* را در خیار دریایی (*Apostichopus japonicus*) گزارش کردند.

با توجه به مطالعات کم در زمینه اثر این پروبیوتیک در گونه‌های ماهی، در مطالعه حاضر تاثیر جیره غذایی حاوی باکتری *Bacillus cereus* بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم گوارشی و همچنین شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره‌های غذایی

باکتری *Bacillus cereus* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (تهران، ایران) تهیه و در محیط کشت MRS (Basingstoke، انگلستان) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌های باکتری به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفوژ (PIT-320، پل ایده‌آل تجهیز، ایران) و در بافر نمک فسفات (PBS) سوسپانسیون شدند. تیمارها بر اساس چهار غلظت ۰، $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$ سلول در گرم تنظیم و به ترتیب با عناوین T_0، T_1، T_2 و T_3 نامگذاری شدند. غلظت‌های انتخاب شده بر اساس نتایج Merrifield و همکاران (۲۰۱۱) انتخاب شد. جیره پایه (T_0) مورد استفاده در این مطالعه (جدول۱)، خرد و با سوسپانسیون‌های

باکتریایی با غلظت‌های مورد نظر ترکیب شد و بر اساس مطالعه قبلی (Ahmadifar et al., 2020) مجددا به صورت پلت در آمد.

جدول ۱: مواد غذایی و ترکیب تقریبی جیره پایه

ترکیب جیره	درصد (وزن خشک)
آرد گندم	۲۸
پودر ماهی	۳۴
گلوتن گندم	۳
پودر سویا	۱۲
آرد ذرت	۱۴
مکمل معدنی*	۳
مکمل ویتامینی*	۳
هم‌بند**	۲
ضدقارچ***	۱
آنالیز شیمیایی جیره	
ماده خشک	۸۹/۵۰
پروتئین خام	۳۲/۴۰
چربی خام	۸/۷۸
خاکستر	۵/۹۲
فیبر	۱۱/۲۰

*: مکمل‌ها مطابق با روش Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) ترکیب شد.
**: هم‌بند Amet (مهرتابان، ایران)
***: ضدقارچ ToxiBan (Vet-A-Mix، Lloyd Inc.، آمریکا)

پلت‌ها در دمای اتاق خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در خلا بسته‌بندی شدند. پس از آماده‌سازی، میزان پروبیوتیک ($۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$) از طریق پخش کردن روی محیط کشت MRS تایید شد.

طرح آزمایشی

در این پژوهش از ماهی‌های کپور معمولی پرورشی با میانگین وزن ۷۰/۵۷±۰/۷۲ گرم و طول ۱۷/۰۸±۰/۱۰ سانتی‌متر در خرداد ماه سال ۱۳۹۸ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی زهک انجام شد. ماهیان برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به مدت ۲ هفته در حوضچه‌ها نگهداری شدند. در این مدت پس از حمام با کلرید سدیم (۲ درصد) تغذیه با جیره پایه انجام شد. پس از سازگاری کامل ماهیان با شرایط پرورشی، ماهی‌ها در ۱۲ وان فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری (۱۵ ماهی در هر وان) با میانگین دمایی ۲۴/۴۰±۲/۱۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۴±۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و pH برابر با ۷/۶±۰/۴ قرار گرفتند. روزانه حدود ۵۰ درصد آب حوضچه‌ها تعویض می‌شد. در این مطالعه، برای هر تیمار سه تکرار (سه وان) اختصاص یافت و در هر تیمار، ماهی‌ها سطوح

مختلف پروبیوتیک را به مدت ۴۵ روز دریافت کردند.

عملکرد رشد

طول و وزن ماهیان هر وان در ابتدا و انتهای دوره ۴۵ روزه ثبت شد. میزان بازماندگی (SR) و شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) از طریق رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Ahmadifar et al., 2020).

رابطه ۱:

$$SR\ (\%) = (N_f / N_i) \times 100$$

N_i: تعداد ماهیان در ابتدای آزمایش؛ N_f: تعداد ماهیان در انتهای آزمایش.

رابطه ۲:

$$WG\ (g) = W_f - W_i$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم).

رابطه ۳:

$$SGR\ (\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ t: طول دوره آزمایش (روز).

بررسی آنزیم‌های گوارشی

از هر وان، ۶ ماهی به طور تصادفی جمع‌آوری و در عصاره گل میخک رقیق شده (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بیهوش شدند. پس از ضدعفونی هر ماهی در کلرید بنزالکونیوم ۰/۱ درصد، روده ماهیان جدا شد و محتویات آن با احتیاط برداشته شد. بعد از شستشو با محلول نمک استریل (NaCl ۰/۸۵ درصد)، روده هر ماهی به صورت دستی در نیتروژن مایع خرد شد و سپس به آن بافر ۲۵ میلی‌مولار تریس هیدروکلرید (pH ۷/۲) اضافه و با ورتکس (LS-100، لاب ترون، ایران) مخلوط شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مقدار پروتئین کل در هر محلول رویی بر اساس روش Lowry (Lowry et al., 1951) تعیین شد. فعالیت تریپسین با استفاده از کیت تریپسین (CK-E91540؛ EASTBIOPHARM، چین) اندازه‌گیری شد. فعالیت کموتریپسین با استفاده از کیت الایزا (CK-E92024؛ EASTBIOPHARM، چین) و کموتریپسین C (CTRC) به روش الایزا اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از روش Bulow و Mosbach (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز با روش ارائه شده توسط Bernfeld و همکاران (۱۹۵۵) اندازه‌گیری شد. تمامی فعالیت‌های آنزیمی بر اساس فعالیت ویژه ($U.mg^{-1}$) محتویات روده ثبت شد.

نمونه‌گیری از خون ماهیان

برای نمونه‌گیری از خون، ۵ ماهی کپور به طور تصادفی از هر وان، جمع‌آوری و در عصاره گل میخک رقیق شده (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بیهوش شدند. نمونه‌های خون به آرامی با استفاده از یک سرنگ پلاستیکی ۵ سی‌سی، از ساقه دمی گرفته شد و به دو قسمت تقسیم شد. اولین قسمت به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس سرم آن جدا و در دمای ۸۰- تا زمان استفاده نگهداری شد. بخش دوم برای مطالعات خون‌شناسی استفاده شد.

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

متابولیت‌های سرم شامل آلبومین، کلسترول، تری‌گلیسرید، گلوکز و آنزیم‌های متابولیکی مانند آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز با استفاده از آنالیزور بیوشیمیایی (Epos 5060، Eppendorf، آلمان) و کیت (پارس آزمون، ایران) انجام شد (Sheikhzadeh et al., 2012).

شاخص‌های خونی

شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون با استفاده از محلول‌های Hayem و Turk صورت گرفت. غلظت هموگلوبین (Hb) با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین (Cyanmethemoglobin Method) تعیین شد. درصد هماتوکریت (Hct) به وسیله لوله‌های مویین میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد (Blaxhall and Daisley, 1973). شاخص حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، میانگین مقدار هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) نیز مطابق با Blaxhall و Daisley (۱۹۷۳) تعیین شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نیز با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Wright-Giemsa انجام شد.

شاخص‌های ایمنی‌شناسی سرم

میزان آنتی‌بادی کل در سرم ماهی با استفاده از روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) انجام شد. بدین منظور، مقدار پروتئین کل قبل و بعد از رسوب به وسیله پلی‌اتیلن گلیکول (Polyethylene Glycol) ۱۲ درصد (Sigma، آمریکا) محاسبه شد.

فعالیت سیستم کمپلمان سرم با استفاده از گلبول‌های قرمز خرگوش (RRBC) به عنوان نشانه انجام شد (Andani et al., 2012). RRBC در بافر ۰/۰۱ مولار ورونال (۰/۰۱ مولار EGTA–Mg–GVB، pH ۷) شستشو داده شد و سوسپانسیون $۲×۱۰^{۸}$ $Cells.mL^{-1}$ به وسیله این بافر تهیه شد. ۲۵۰ میکرولیتر از سرم آزمایشی به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون RRBC اضافه شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه با جریانی مداوم انکوبه شد. در هر تیوب، ۰/۵۸ درصد محلول NaCl (۳/۱۵ میکرولیتر) اضافه شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. میزان کدورت در طول موج ۴۱۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Bio-Rad، آمریکا) برای محاسبه مقدار هموگلوبین موجود درمحلول رویی، تعیین شد. حجم نمونه‌های تولیدی ۵۰ درصد همولیز، برای محاسبه میزان فعالیت کمپلمان سرم در هر نمونه محاسبه شد.

فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش Demers و Bayne (۱۹۹۷) انجام شد. به طور خلاصه، سوسپانسیون *Micrococcus luteus* (Sigma، آمریکا) به میزان ۱۷۵ میکرولیتر در بافر فسفات- سیترات (۰/۱ مولار) به طور جداگانه به نمونه‌های سرم (۲۵ میکرولیتر) در ۹۶ میکروپلیت با ۳ تکرار اضافه شد. کدورت به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۶۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا ریدر (Hiperion، آلمان) ثبت شد. برای استاندارد، محلول لیزوزیم تخم‌مرغ (Sigma، آمریکا) از ۰ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از همان بافر تهیه شد. واحد فعالیت معادل هر نمونه سرم در مقایسه با استاندارد تعیین شد و به صورت میکروگرم در میلی‌لیتر از هر نمونه سرم ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج این پژوهش از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها و نیز معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تمام نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند.

نتایج

عملکرد رشد

بر اساس نتایج جدول ۲، تفاوت معنی‌داری در میانگین وزن و طول اولیه، طول نهایی و نرخ

رشد ویژه ماهیان کپور معمولی تیمار شده با سطوح مختلف پروبیوتیک *Bacillus cereus* مشاهده نشد (P>۰/۰۵). میزان بقا در همه گروه‌ها ۱۰۰ درصد ثبت شد. در مقابل، میانگین وزن نهایی و افزایش وزن در گروه T_3 ($۱۰^{۹}$ باکتری در گرم) در مقایسه با گروه شاهد (بدون دریافت پروبیوتیک) به صورت معنی‌داری بهبود یافت (P<۰/۰۵).

فعالیت آنزیم‌های گوارشی

نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی (جدول ۳) نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز در همه گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵). در مقابل، میزان فعالیت آنزیم تریپسین تنها در گروه T_3 در قیاس با گروه شاهد افزایش یافت. اما فعالیت آنزیم کیموتریپسین در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

شاخص‌های بیوشیمیایی

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش (جدول ۴)، تغییرات میزان کلسترول، گلوکز، آلکالین فسفاتاز و آلانین ترانسفراز خون در میان تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

جدول ۲: شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus cereus* در پایان دوره ۴۵ روز

شاخص	T_0	T_1	T_2	T_3
میانگین وزن اولیه (گرم)	۷۰/۸۶±۰/۶۹	۷۱/۰۶±۰/۳۹	۷۱/۱۱±۰/۵۵	۷۰/۷۵±۰/۷۱
میانگین طول اولیه (سانتی‌متر)	۱۷/۱۲±۰/۱۸	۱۷/۴۶±۰/۳۲	۱۷/۱۲±۰/۴۸	۱۷/۲۸±۰/۳۶
میانگین وزن نهایی (گرم)	۸۴/۰۵±۱/۲۱ [a]	۸۴/۲۴±۱/۳۵ [a]	۸۵/۸۱±۲/۱۰ [ab]	۸۷/۸۷±۱/۰۲ [b]
میانگین طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۸/۳۱±۰/۴۱	۱۸/۵۵±۰/۳۱	۱۸/۴۹±۰/۳۶	۱۸/۷۸±۰/۵۹
افزایش وزن (گرم)	۱۳/۰۱±۱/۲۵ [a]	۱۳/۱۸±۲/۲۵ [a]	۱۴/۱۰±۱/۳۲ [a]	۱۷/۱۲±۲/۲۵ [b]
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۰/۲۷±۰/۰۵ [a]	۰/۳۰±۰/۰۳ [ab]	۰/۳۳±۰/۰۱ [ab]	۰/۳۹±۰/۰۳ [b]
بازماندگی (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

T_0: شاهد (بدون دریافت باکتری در جیره)؛ T_1: $۱۰^{۷}$ باکتری در گرم؛ T_2: $۱۰^{۸}$ باکتری در گرم؛ T_3: $۱۰^{۹}$ باکتری در گرم.

جدول ۳: تغییرات آنزیم‌های روده ماهی کپور تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus cereus* در پایان دوره ۴۵ روز

شاخص	T_0	T_1	T_2	T_3
آمیلاز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	۷/۳۲±۰/۲۹ [a]	۷/۸۰±۰/۲۸ [b]	۷/۸۶±۰/۳۷ [b]	۸/۰۰±۰/۳۵ [b]
لیپاز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	۱/۸۸±۰/۱۴ [a]	۲/۱۴±۰/۱۸ [b]	۲/۱۶±۰/۱۶ [b]	۲/۱۷±۰/۱۵ [b]
تریپسین (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	۰/۱۰۸±۰/۰۰۴ [a]	۰/۱۰۵±۰/۰۱۶ [ab]	۰/۱۱۷±۰/۰۱۰ [ab]	۰/۱۱۹±۰/۰۰۹ [b]
کموتریپسین (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	۰/۰۲۱±۰/۰۰۲	۰/۰۲۵±۰/۰۰۵	۰/۰۲۵±۰/۰۰۵	۰/۰۲۶±۰/۰۰۲

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0/05$).

T_0: شاهد (بدون دریافت باکتری در جیره)؛ T_1: 10^7 باکتری در گرم؛ T_2: 10^8 باکتری در گرم؛ T_3: 10^9 باکتری در گرم.

جدول ۴: شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus cereus* در پایان دوره ۴۵ روز

شاخص	T_0	T_1	T_2	T_3
آلبومین (گرم در دسی‌لیتر)	۶/۹۹±۰/۴۲ [a]	۷/۳۶±۰/۲۰ [ab]	۷/۶۲±۰/۳۸ [b]	۷/۸۴±۰/۵۵ [b]
تری گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۴۵/۵۰±۳/۹۳ [a]	۱۵۰/۲۰±۶/۳۸ [ab]	۱۵۷/۸۳±۱۱/۴۶ [b]	۱۵۸/۵۰±۱۰/۳۵ [b]
کلسترول (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۸۹/۰۰±۸/۳۹	۸۷/۳۳±۸/۵۲	۹۲/۱۷±۹/۷۷	۸۶/۵۰±۱۱/۷۱
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۰۸/۱۶±۶/۷۰	۱۰۶/۶۷±۶/۳۵	۱۱۱/۶۷±۱۴/۳۶	۱۰۷/۰۰±۸/۶۵
آلکالین فسفاتاز (واحد بین المللی در دسی‌لیتر)	۲۴۷/۸۳±۶/۷۰	۲۵۲/۸۳±۱۴/۰۱	۲۴۲/۸۳±۲۰/۸۰	۲۵۶/۳۳±۱۲/۰۸
آلانین ترانسفراز (واحد بین المللی در دسی‌لیتر)	۲۱/۳۳±۳/۳۳	۲۰/۶۷±۳/۲۰	۲۱/۵۰±۳/۲۱	۲۲/۳۳±۲/۷۳
آسپارات آمینوترانسفراز (واحد بین المللی در دسی‌لیتر)	۱۴۳/۸۳±۵/۸۷ [a]	۱۴۴/۳۳±۱۵/۶۵ [a]	۱۶۲/۳۳±۹/۸۷ [b]	۱۵۶/۱۷±۱۴/۲۲ [b]

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0/05$).

T_0: شاهد (بدون دریافت باکتری در جیره)؛ T_1: 10^7 باکتری در گرم؛ T_2: 10^8 باکتری در گرم؛ T_3: 10^9 باکتری در گرم.

با افزایش میزان *B. cereus* در جیره غذایی ماهیان کپور معمولی، میزان آلبومین، تری‌گلیسیرید و آسپارات آمینوترانسفراز به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری که ماهیان تغذیه شده با جیره T_3 بالاترین میزان از این شاخص‌ها را نشان دادند ($P<0/05$).

شاخص‌های خون‌شناسی

با توجه به جدول شماره ۵، تغییرات هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول قرمز، نوتروفیل و مونوسیت در میان تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در مقابل، در گروه T_3 افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و نسبت لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵).

شاخص‌های ایمنولوژیک سرم

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۶، در گروه T_3 افزایش معنی‌داری در میزان شاخص‌های ایمنی، شامل میزان آنتی‌بادی کل، فعالیت کمپلمان و فعالیت لیزوزیم در مقایسه با گروه شاهد دیده شد (P<۰/۰۵). در مقابل، دیگر گروه‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵).

جدول ۵: شاخص‌های خون‌شناسی کپور معمولی تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus cereus* در پایان دوره ۴۵ روز

شاخص	T_0	T_1	T_2	T_3
گلبول سفید × ۱۰^۳ (سلول در میلی‌متر مکعب)	۴/۱۳±۰/۲۰ [a]	۴/۱۶±۰/۳۰ [a]	۴/۲۱±۰/۲۰ [a]	۴/۵۱±۰/۲۰ [b]
گلبول قرمز × ۱۰^۶ (سلول در میلی‌متر مکعب)	۱/۱۹±۰/۰۶	۱/۱۸±۰/۰۹	۱/۲۱±۰/۰۸	۱/۲۴±۰/۱۳
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۵/۷۰±۰/۴۶	۵/۷۳±۰/۵۷	۵/۸۰±۰/۳۶	۵/۹۹±۰/۳۷
هماتوکریت (درصد)	۳۱/۵۰±۳/۲۷	۳۳/۰۰±۲/۹۰	۳۲/۸۳±۲/۴۸	۳۴/۳۳±۲/۰۷
MCV (فمتولیتر)	۲۶۰/۰۱±۲۵/۴۹	۲۷۹/۶۵±۲۴/۵۶	۲۷۱/۳۴±۲۰/۵۲	۲۷۶/۸۷±۱۶/۶۵
MCH (پیکوگرم)	۴۷/۸۹±۳/۹۴	۴۸/۵۵±۴/۸۲	۴۷/۹۴±۲/۹۷	۴۸/۱۹±۲/۷۸
MCHC (گرم در دسی‌لیتر)	۱۸/۲۵±۲/۴۹	۱۷/۵۲±۲/۸۲	۱۷/۷۱±۱/۱۸	۱۷/۵۳±۱/۹۳
لنفوسیت (درصد)	۸۸/۶۶±۱/۷۵ [a]	۹۰/۱۷±۲/۷۹ [ab]	۹۰/۸۳±۱/۹۴ [ab]	۹۱/۸۳±۲/۴۰ [b]
نوتروفیل (درصد)	۸/۳۳±۱/۲۱	۷/۰۰±۱/۷۹	۶/۵۰±۲/۷۴	۶/۰۰±۲/۶۸
مونوسیت (درصد)	۳/۰۰±۰/۸۹	۲/۸۳±۱/۱۷	۲/۶۷±۱/۶۳	۲/۱۷±۱/۱۷

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

T_0: شاهد (بدون دریافت باکتری در جیره)؛ T_1: ۱۰^۷ باکتری در گرم؛ T_2: ۱۰^۸ باکتری در گرم؛ T_3: ۱۰^۹ باکتری در گرم.

جدول ۶: شاخص‌های ایمنی در سرم ماهی کپور تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus cereus* در پایان دوره ۴۵ روز

شاخص	T_0	T_1	T_2	T_3
میزان آنتی بادی کل (درصد)	۱۲/۷۱±۰/۵۹ [a]	۱۲/۹۷±۰/۶۴ [ab]	۱۳/۱۵±۰/۴۳ [ab]	۱۳/۷۷±۰/۸۲ [b]
فعالیت کمپلمان (واحد در میلی‌لیتر)	۱۳۱/۵۰±۵/۳۱ [a]	۱۴۴/۳۳±۹/۱۸ [ab]	۱۵۶/۳۳±۷/۲۸ [ab]	۱۵۵/۰۰±۱۰/۹۰ [b]
فعالیت لیزوزوم (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۳۹/۸۳±۴/۳۰ [a]	۴۲/۳۳±۳/۱۴ [ab]	۴۲/۸۳±۲/۳۲ [ab]	۴۵/۸۳±۲/۷۱ [b]

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

T_0: شاهد (بدون دریافت باکتری در جیره)؛ T_1: $۱۰^{۷}$ باکتری در گرم؛ T_2: $۱۰^{۸}$ باکتری در گرم؛ T_3: $۱۰^{۹}$ باکتری در گرم.

بحث

در بسیاری از کشورها، به علت نگرانی عمومی از اثرات احتمالی پس مانده‌های آنتی‌بیوتیکی و یا بروز گونه‌های باکتری مقاوم به دارو، استفاده از آنتی‌بیوتیک ممنوع شده است (Dawood et al., 2018). یکی از روش‌های به کار رفته برای حفظ سلامت آبزی و در عین حال کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از مکمل‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها است که بسیار مورد توجه پژوهشگران و پرورش‌دهندگان قرار گرفته است (Dawood et al., 2018). این نوع مکمل‌های غذایی علاوه بر تامین مواد مغذی لازم در جهت حمایت از رشد و نمو ماهیان می‌توانند در افزایش سلامت و مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا مفید واقع شوند.

عملکرد رشد ماهی تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند ساختار روده، فلور روده، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تعداد کل باکتری‌ها است که تمامی این عوامل توسط پروبیوتیک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Perez-Sanchez et al., 2014). در پژوهش حاضر استفاده از پروبیوتیک *Bacillus cereus* در جیره غذایی ماهی کپور معمولی سبب بالا رفتن شاخص افزایش وزن پس از مصرف بالاترین مقدار پروبیوتیک شد. همسو با این مطالعه، کلیائی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی تاثیر باکتری *Bacillus subtilis* استخراج شده از روده ماهی کپور را بر عملکرد رشد و بقا این ماهی، بیان کردند که شاخص‌های رشد مانند افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و کارایی ضریب تبدیل در ماهیانی که از جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه کرده بودند، بالاتر و مطلوب‌تر

از ماهیانی بود که جیره آن‌ها فاقد پروبیوتیک بود. در مطالعه حاضر، ضریب رشد ویژه و افزایش وزن در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین نتایج مشابهی با پروبیوتیک *Streptococcus faecium* در کپور ماهی به دست آمد که نشان می‌دهد گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک، بیشترین وزن و ضریب رشد ویژه را داشتند (Bogut et al., 1999). این بهبود عملکرد رشد به دنبال مصرف پروبیوتیک‌ها، با دخالت مستقیم در جذب مواد مغذی و یا با فراهم کردن مواد مغذی و یا ویتامین‌ها به دست می‌آید که در نهایت بر عمل گوارش و افزایش وزن موثر است (Perez-Sanchez et al., 2014).

مطالعه آنزیم‌های گوارشی یک گام ضروری به سوی پی بردن به مکانیسم گوارش ماهی است. آنزیم‌ها نقش مهمی در گوارش مواد غذایی بر عهده دارند و آگاهی از سطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت گوارشی ماهیان موثر باشد. از طرف دیگر، تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشد (Ahmadifar et al., 2020). در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده از استفاده باکتری *B. cereus* بر فعالیت آنزیم پروتئاز، آلفا آمیلاز و لیپاز نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای حاوی باکتری و گروه شاهد است. در مطالعه Wang و Xu (۲۰۰۶) با افزودن پروبیوتیک *Bacillus* sp. و باکتری‌های فتوسنتز کننده به جیره کپور معمولی افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و لیپاز مشاهده شد. در مقابل، در مطالعه Wu و همکاران (۲۰۱۲)، مصرف پروبیوتیک *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) به وجود نیاورد که در تضاد با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است. البته عوامل زیادی بر نتایج متضاد به دست آمده از مطالعات مختلف موثر است که می توان به مواردی چون وضعیت تغذیه، ریتم‌های فیزیولوژیکی، شرایط آزمایشی متفاوت، روش‌های مختلف جمع‌آوری نمونه و گونه ماهی مورد بررسی اشاره کرد (Hidalgo et al., 1999; Lopez-Vasquez et al., 2009).

شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی خون در ماهیان نشان دهنده تغییرات سلامت در ماهیان است (Burgos-Aceves et al., 2019). در پژوهش حاضر، نتایج به دست آمده از بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم نشان داد که

میزان آلبومین بین تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. مطالعه Nayak و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که مصرف همزمان پروبیوتیک *B. subtilis* و ویتامین C قادر به بالا بردن آلبومین سرمی در کپور هندی بزرگ (*Labeo rohita*) است. آلبومین سرم نقش مهمی در حفظ تعادل اسمزی میان خون و بافت‌ها ایفا می‌کند (Khan et al., 2016). در مطالعه حاضر، بررسی شاخص‌های خون‌شناسی نشان داد که میزان هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول قرمز، نوتروفیل و مونوسیت در میان تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود ولی با افزایش غلظت باکتری تا $۱۰^{۹}$ سلول در گرم، میزان لنفوسیت و گلبول سفید به طور معنی‌داری افزایش یافت. گلبول‌های سفید به عنوان اولین خط دفاعی بدن علیه بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط عوامل بیماری‌زا عمل می‌کنند (Yeganeh et al., 2015). بنابراین، افزایش تعداد این سلول‌ها نشان دهنده اثرات ایمنی‌زایی و دفاع میکروبی توسط پروبیوتیک *B. cereus* است. از طرف دیگر، دیواره سلولی گلیکوپپتیدی *Bacillus*ها از طریق فعال‌سازی لنفوسیت‌ها به افزایش پاسخ ایمنی موجود آبزی منجر می‌شود (Joborn et al., 1997).

همگام با افزایش تعداد گلبول سفید و لنفوسیت، در گروه دریافت کننده بالاترین مقدار پروبیوتیک بهبود پاسخ‌های ایمنی با بررسی شاخص‌های مختلف مانند میزان آنتی‌بادی کل، فعالیت لیزوزیم و کمپلمان سرم دیده شد. بر اساس نتایج این بررسی، با افزایش میزان باکتری مورد نظر در جیره، میزان آنتی‌بادی کل سرمی افزایش یافت. به طوری که ماهیان تغذیه شده با بیشترین میزان پروبیوتیک، دارای بالاترین ایمنوگلوبین بودند. در واقع آنتی‌ژن‌های سطح *Bacillus* و یا متابولیت‌های آن ممکن است نقش ایمونوژن را برای دفاع و ایمنی بدن ایفا کنند. همچنین ثابت شده است که سیستم ایمنی غیراختصاصی توسط پروبیوتیک‌ها تحریک می‌شود (Perez-Sanchez et al., 2014) و از آنجا که باکتری‌های پروبیوتیکی تولید آنتی‌بادی را در بدن تحریک می‌کنند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که سطح ایمنوگلوبین در بدن تیمارهای پروبیوتیکی بالاتر نسبت به تیمارهای دیگر و گروه شاهد، بیشتر باشد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. فعالیت لیزوزوم یکی دیگر از ترکیبات ایمنی برای از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا است. افزایش لیزوزیم در جریان خون ماهی‌های دریافت کننده پروبیوتیک مربوط به افزایش

تکثیر سلول‌های بیگانه‌خوار است که در نهایت سبب تقویت سیستم ایمنی در گروه‌های تیمار با پروبیوتیک می‌شود. سیستم کمپلمان نیز با حضور ۳۵ پروتئین پلاسمایی محلول نقش مهمی را در از بین بردن عوامل بیماری‌زا در بدن ایفا می‌کند. مطالعات مختلف نشان دهنده اثرات مکمل‌های غذایی بر تقویت سیستم کمپلمان در ماهی است (Boshra and Sunyer, 2006; Ringo et al., 2012; Song et al., 2014) که با نتیجه به دست آمده در این مطالعه همخوانی دارد.

آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز، آلانین ترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز جز آنزیم‌های مهم در سلامت ماهیان هستند و افزایش آن‌ها نشان دهنده آسیب‌های کبدی است. نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف باکتری *B. cereus* سبب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آسپارات آمینوترانسفراز شد، در حالی که دیگر آنزیم‌های متابولیکی کبدی تغییری را نشان ندادند. به صورت مشابه، Bandyopadhyay و Das Mohapatra (۲۰۰۹) با افزودن پروبیوتیک *Bacillus circulans* به جیره ماهی کاتلا (*Catla catla*) تاثیر معنی‌داری را در میزان آنزیم‌های متابولیکی کبدی در گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند. به نظر می‌رسد که در زمینه وجود و یا فقدان ضایعات کبدی نیاز به مطالعات بیشتر مانند بررسی‌های آسیب‌شناسی باشد تا اثرات منفی احتمالی ناشی از مصرف این پروبیوتیک بر بافت کبدی تایید شود.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف پروبیوتیک *Bacillus cereus*، به ویژه به میزان $۱۰^{۹}$ سلول در هر گرم جیره، سبب بهبود رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و پاسخ‌های ایمنی ذاتی در کپور معمولی شد. مطالعات بیشتر در باره بررسی مکانیسم اثر این پروبیوتیک و مقایسه این گونه *Bacillus* با گونه‌های دیگر در ماهی مورد نیاز است.

منابع

کلیائی ز.، آبرومند ع. و ضیایی‌نژاد س. ۱۳۹۵. تاثیر باکتری زیست‌یار *Bacillus subtilis* مستخرج از روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر عملکرد رشد و بقاء آن. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۲): ۱۰۸-۹۹.

Ahmadifar E., Sadegh T.H., Dawood M.A.O., Dadar M. and Sheikhzadeh N. 2020. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 516: 1–39 (734656).

Andani H., Tukmechi A., Meshkini S. and 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.

Bandyopadhyay P. and Das Mohapatra P.K. 2009. Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: On growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham). Fish Physiology and Biochemistry, 35: 467–478.

Bernfeld P. 1955. Amylase, α and β. P: 149–158. In Colowick S.P. and Kaplan N.O. (Eds.). Methods in Enzymology. Academic Press, USA.

Blaxhall P.C. and Daisley K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology, 5: 771–781.

Bogut I., Milakovic Z., Bukvic Z., Brkic S. and Zimmer R. 1999. Influence of probiotic *Streptococcus faecium* on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). Czech Journal of Animal Science, 43(5): 231–235.

Boshra H., Li J. and Sunyer J.O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology, 20: 239–262.

Bulow L. and Mosbach K. 1987. The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. FEBS Letters, 210(2): 147–152.

Burgos-Aceves M.A., Lionetti L. and Faggio C. 2019. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced

response in fish. Science Total Environment, 670: 1170–1183.

Cho H.C. and Lee S.M. 2012. Onion powder in the diet of the Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): Effects on the growth, body composition and lysozyme activity. World Aquaculture Society, 43(1): 30–38.

Dawood M.A.O., Koshio S. and Esteban M.A. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. Reviews in Aquaculture, 10: 950–974.

De Souza D.M., Bernardes Martins G., Noguez Piedras S.R., Fernandes Pouey J.L.O., Robaldo R.B. and Leivas Leite F.P. 2012. Probiotic actions of *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* in silver catfish (*Rhamdia quelen*) larvae culture. Revista Brasileira de Zootecnia, 41(3): 815–819.

Demers N.E. and Bayne C.J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Developmental and Comparative Immunology, 21: 363–373.

Evelyn E. and Silva F.V.M. 2015. Thermosonication versus thermal processing of skim milk and beef slurry modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. Food Research International, 67: 67–74.

Hao K., Liu J.Y., Ling F., Liu X.L., Lu L., Xia L. and Wang G.X. 2014. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 428-429: 141–149.

Hidalgo M.C., Urea A. and Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. proteolytic and amylase activities. Aquaculture, 170: 267–283.

Hoseinifar S.H., Zoheiri F. and Lazado C.C. 2016. Dietary phyto immunostimulant Persian hogweed (*Heracleum persicum*) has more remarkable impacts on skin mucus than on serum in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish and Shellfish Immunology, 32: 59–77.

Joborn A., Olsson C., Westerdahl A., Conway P.L. and Kjellberg S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extract by *Camobacterium* sp. Strain. Journal of Fish Disease, 20: 383–392.

Khan A., Shah N., Sayed Khan M., Saleem Ahmad M., Farooq M., Adnan M., Muhammad Jawad S., Ullah H. and Muhammad Yousafzai A. 2016. Quantitative determination of lethal concentration LC50 of atrazine on

biochemical parameters; total protein and serum albumin of freshwater fish grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Polish Journal of Environmental Studies, 25(4): 1555–1561.

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

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry, 193: 265–275.

Merrifield D., Bradley G., Harper G., Baker R., Munn C. and Davies S. 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition, 17: 73–79.

Messaoudi K., Clavel T., Schmitt P.H. and Duport C. 2010. Mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F73/4430. Research in Microbiology, 61(1): 30–39.

NavinChandran M., Iyapparaj P., Moovendhan S., Ramasubburayan R., Prakash S., Immanuel G. and Palavesam A. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. Fish and Shellfish Immunology, 36: 38–45.

Nayak S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, 29: 2–14.

Nayak S.K., Swain P. and Mukherjee S.C. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology, 23: 892–896.

Otatake M., Kiryu I. and Nakanishi T. 2002. Development of vaccine delivery method for fish: Parcutaneous administration by immersion with application of multiple puncture instruments. Vaccine, 1: 3764–3769.

Perez-Sanchez T., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I. and Balcazar J.L. 2014. Probiotics in aquaculture: A current assessment. Reviews in Aquaculture, 6: 133–146.

Ringo E., Olsen R.E., Vecino J.L.G., Wadsworth S. and Song S.K. 2012. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A

review. Journal of Marine Science: Research and Development, 2(1): 1–22.

Sheikhzadeh N., Tayefi-Nasrabadi H., Khani Oushan A. and Najafi Enferadi M.H. 2012. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 38(2): 413–419.

Siwicki A.K., Anderson D.P. and Rumsey G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 125–139.

Song S.K., Bo R.B., Kim D., Park J., Jungjoon K., Hyun D.K. and Ringo E. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. Fish and Shellfish Immunology, 40: 40–48.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4): 655–671.

Wang Y.B. and 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.

Wu Z.X., Feng X., Xie L.L., Peng X.Y., Yuan J. and Chen X.X. 2012. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora. Journal of Applied Ichthyology, 28: 721–727.

Yeganeh S., Teimouri M. and Keramat Amirkolaie A. 2015. Dietary effects of *Spirulina platensison* hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research in Veterinary Science, 101: 84–88.

Zhao Y., Yuan L., Wan J., Sun Z., Wang Y. and Sun H. 2016. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas*. Fish and Shellfish Immunology, 49: 237–242.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 8, No. 3, Autumn 2020

Research Paper

Modulation of growth performance, digestive enzyme activity, serum biochemical and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) using probiotic *Bacillus cereus*

Toba Heidari Sadegh[1], Ehsan Ahmadifar[2]*, Maryam Dadar[3], Najmeh Sheikhzadeh[4]

Received: February 2020 Accepted: April 2020

Abstract

The genus of Bacillus, due to its higher resistance to harsh environmental conditions, is the most broadly used probiotic in aquaculture. The present study was designed to investigate the effects of *Bacillus cereus* on growth, digestive enzyme activity and serum biochemical and immunological indices in common carp (*Cyprinus carpio*). After the 14-day acclimatization, fish with mean weight of 70.57±0.72g dividing into 12 tanks (15 fish per tank) were fed by basal diet (control group) and diets containing probiotic *B. cereus* in 3 doses, including 10^7, 10^8, and 10^9 CFU.g^{-1}. After 45 days feeding, the diet with higher dose of probiotic showed significantly better result of weight gain, digestive enzyme activities for trypsin, amylase and lipase, white blood cell and lymphocyte counts, total antibody level, lysozyme and protease activities than those with the control diet ($P<0.05$). In addition, albumin, triglyceride and aspartate aminotransferase levels were remarkably higher in medium and high doses than the control group ($P<0.05$). Based on the present results, supplementation of probiotic *B. cereus*, especially at 10^9 CFU.g^{-1}, is recommended to enhance the growth performance, hemato-immunological responses, and digestive enzyme activities in common carp.

Key words: Bacillus cereus, *Common Carp, Growth, Digestive Enzyme, Biochemical Parameters, Immunological Parameters*.

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Assistant Professor in Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
4- Associate Professor in Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding Author: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir