CC BY

**مقاله علمی – پژوهشی:**

# اثرات جیره‌های حاوی باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Lactococcus lactis* بر خون‌شناسی سلولی و آنزیم‌های گوارشی ماهی اسکار ببری (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831)

عباس حسنی نیا[۱]، حبیب وهابزاده رودسری*[۱]، حسین خارا[۱]، علیرضا شناور ماسوله[۲]، محدثه احمدنژاد[۳]

*habib.vahabzadeh@gmail.com

۱- گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱٦۱٦

۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی رشت، ایران، صندوق پستی: ۳٤٦٤-٤۱٦۳٥

۳- پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر انزلی، ایران، صندوق پست: ٦٦

تاریخ دریافت: اسفند ۱٤۰۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱٤۰۱

## چکیده

ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) یکی از محبوب‌ترین ماهیان آکواریومی نیاز به توجه بیشتری جهت فراهم آوردن سلامت در شرایط پرورشی دارد. با توجه به گسترش به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در صنعت آبزی‌پروری، این تحقیق جهت ارزیابی اثرات باکتری‌های *Lactococcus lactis* و *Bacillus subtilis* بر آنزیم‌های گوارشی و خون‌شناسی ماهی به عنوان شاخص‌های سلامت اسکار انجام گرفت. آزمایش با ۳۰۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی ۸/۹٦±۰/۰۳ گرم و طول ۰/۰۲± ۸/۲۳ سانتی‌متر طی ۷۰ روز با جیره حاوی باکتری‌های مذکور در ۹ گروه تیماری با غلظت باکتریایی $10^{10}$ CFU/g به صورت مقادیر ۱٥۰، ۳۰۰ و ٤٥۰ میلی‌گرم باکتری افزوده شده در هر کیلوگرم غذا و تیمارهای ترکیبی دو نوع باکتری‌ها به اندازه ۷٥ و ۲۲٥ میلی‌گرم در هر کیلو غذا و تیمار شاهد طراحی شد. در پایان دوره پرورش، نتایج حاصل از شاخص‌های خونی نشان‌دهنده افزایش گلبول‌های قرمز، مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۳ ($LL_{450}$) بود ($P<0.05$). همچنین نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در بین تیمارهای دریافت‌کننده باکتری به‌ویژه تیمار ۳ ($LL_{450}$) از نظر آماری به طور معنی‌داری با شاهد متفاوت بود ($P<0.05$).

**کلمات کلیدی:** پروبیوتیک، ماهی اسکار، *Lactococcus lactis*، *Bacillus subtilis*، آنزیم‌های گوارشی، سلول‌های خونی



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

## مقدمه

بیشترین تجارت ماهی‌های زینتی مربوط به گونه‌های آب شیرین است (Whittington and Chong, 2007; Marlianingrum *et al*., 2022). سلامتی و تغذیه دو جنبه مهم در تجارت ماهی‌های زینتی است (Ghosh *et al*., 2008). ایجاد حالت پایدار در دستگاه گوارش ماهی باعث افزایش هضم و جذب و ایمنی ماهی می‌شود (Naiel *et al*., 2022). تأثیر استفاده از پربیوتیک‌ها بر فاکتورهای خونی و تغذیه‌ای در گونه‌های مختلفی از سیکلیدها مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله می‌توان به مطالعه Firouzbakhsh و همکاران (۲۰۱۱)، Safari و Mehraban (۲۰۱۳) در جیره غذایی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)، Won و همکاران (۲۰۲۰) در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) اشاره کرد. ماهی اسکار گونه‌ای گوشتخوار و یک ماهی همیشه گرسنه است که حتی در حالت سیری نیز علاقه به دریافت مواد غذایی دارد. این ماهی از خانواده Cichlidae به دلیل زیبایی خاصی که دارد، به عنوان یک ماهی زینتی محبوب تبدیل شده است (Hassaninia *et al*., 2022).

امروزه به‌خوبی مشخص شده است که عملکرد دستگاه گوارش جانوران آبزی می‌تواند از طریق تعدیل میکروبی با استفاده از سویه‌های متعدد باکتری‌های پروبیوتیک خوراکی بهینه شود (Li *et al*., 2021). همچنین می‌توان با مصرف میکروب‌های مفید در جهت کاهش یا حذف باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب اقدام نمود، چون آنها می‌توانند بر عملکرد رشد، تعادل میکروبی روده و فعالیت‌های آنزیمی ماهی‌ها تاثیر بگذارند (Hasan and Banerjee, 2020). در مطالعه حاضر، اثرات پروبیوتیک افزودن باکتری‌های *Lactococcus lactis* و *Bacillus subtilis* به خوراک بر وضعیت خون‌شناسی سلولی، آنزیم‌های گوارشی و بافت روده ماهی اسکار بررسی شده است. از آن‌جایی‌که پرورش ماهیان زینتی در دنیا بسیار رونق دارد، نتایج این تحقیق می‌تواند در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی، کارخانجات تولید غذای آبزیان و مراکز فروش ماهیان زینتی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

## مواد و روش کار

این مطالعه در تابستان ۱۳۹۸ در سالن تکثیر و پرورش ماهیان زینتی مرکز آموزش جهاد کشاورزی میرزا کوچک خان به مدت ۷۰ روز انجام گرفت. در این تحقیق از ۳۰۰ قطعه بچه ماهی اسکار ببری حاصل تکثیر یک جفت مولد با میانگین وزنی ۰/۰۳۳±۸/۹۶ گرم و میانگین طولی ۰/۰۲±۸/۲۳ سانتی‌متر در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تیمار و هر یک با ۳ تکرار به صورت تصادفی انتخاب شدند. ماهی‌ها پس از یک دوره ۱۰ روزه سازگاری با محیط و غذا در ۳۰ آکواریوم شیشه‌ای با حجم ۵۰ لیتر آب و تراکم کشت ۱۰ عدد آزمایش شدند. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دمای آب با میانگین ۰/۳۲±۲۷/۸۴ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول آب با میانگین ۰/۴۴±۷/۶۷ میلی‌گرم در لیتر با دستگاه اکسیژن‌متر دیجیتال (WTW oxi 3205 SET3) و pH آب با میانگین ۰/۲۱±۷/۳۶ با دستگاه پی‌اچ‌متر (JENWAY 370)به صورت روزانه و سختی‌آب DH با میانگین ۰/۴±۱۷۲/۴ میلی‌گرم در لیتر به صورت هفتگی و آمونیاک $NH_4$ هر ده روز یکبار قبل از غذادهی حدود ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر با کیت اندازه‌گیری آمونیاک (VAHEB) در کلیه آکواریوم‌ها اندازه‌گیری شد و همواره در تمام دوره پرورش در تیمارها تغییری مشاهده نشد (جدول ۱). با پمپ هواده (RESUN ACO – 010) با قدرت اکسیژن‌دهی ۰/۱۳۵ مترمکعب در دقیقه، هوادهی صورت گرفت.

**جدول ۱: دامنه تغییرات پارامترهای آب آکواریوم ها در طول دوره ۷۰ روز پرورش**

| دما (درجه سانتی‌گراد) | اکسیژن محلول (ppm) | pH | سختی DH | آمونیاک ($mg\ l^{-1}$) | نیتریت ($mg\ l^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| ۲۷/۸۴ ± ۰/۳۲ | ۷/۶۷ ± ۰/۴۴ | ۷/۳۶ ± ۰/۲۱ | ۱۷۲/۴ ± ۰/۴ | ۰/۰۷ | ۰/۰۴ |

باکتری *Bacillus subtilis* به صورت فراورده‌های میکروبی تجاری با علامت اختصاری B.S و باکتری *Lactococcus lactis* جدا شده از دستگاه گوارش آبزیان با علامت اختصاری L.Lکه از تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* جداسازی



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]
[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

و در NCBI با شماره JF831150 مورد ثبت قرار گرفته است. سه جیره حاوی باکتری‌های *B. subtilis* و *L. lactis* و مخلوط آنها به طور مساوی تهیه شد. میزان مصرف باکتری‌های L.L و B.S $10^{10}$ CFU/g به‌ترتیب در مقادیر ۱۵۰-۳۰۰-۴۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا آماده گردید (جدول ۲).

**جدول ۲: معرفی تیمارهای مورد بررسی**

| تیمار | محتویات غذایی | میزان مصرف باکتری |
|---|---|---|
| (1) $LL_{150}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Lactococcus lactis* | ۱۵۰ml/kg |
| (2) $LL_{300}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Lactococcus lactis* | ۳۰۰ml/kg |
| (3) $LL_{450}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Lactococcus lactis* | ۴۵۰ml/kg |
| (4) $BS_{150}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Bacillus subtilis* | ۱۵۰ml/kg |
| (5) $BS_{300}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Bacillus subtilis* | ۳۰۰ml/kg |
| (6) $BS_{450}$ | غذای کوپنز حاوی باکتری *Bacillus subtilis* | ۴۵۰ml/kg |
| (7) $MIX_{150}$ | غذای کوپنز حاوی مخلوط باکتری‌های *B. subtilis* و *L. lactis* | ۷۵+۷۵ml/kg |
| (8) $MIX_{300}$ | غذای کوپنز حاوی مخلوط باکتری‌های *B. subtilis* و *L. lactis* | ۱۵۰+۱۵۰ml/kg |
| (9) $MIX_{450}$ | غذای کوپنز حاوی مخلوط باکتری‌های *B. subtilis* و *L. lactis* | ۲۲۵+۲۲۵ml/kg |
| (10) Control | غذای کوپنز بدون باکتری | ۰ |

جهت غنی‌سازی در جیره غذایی ماهیان، مقادیر مورد نظر از پودر باکتری‌های L.L و B.S در زیر هود لامینار در ظروف پلاستیکی استریل توزین شده و سپس ۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به‌ازاء هر کیلو غذا اضافه شد. همچنین جهت یکسان بودن وضعیت تیمار شاهد با سایر تیمارها به جیره غذایی تیمار شاهد نیز ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی بدون ماده موثر اضافه و محلول به طور یکسان بر غذا اسپری شد. محلول‌های تهیه شده از نسبت‌ها و غلظت‌های باکتری‌ها بر غذای مخصوص بچه ماهی کوپنز TROCO CRUMBLE HE با اندازه پلیت ۱/۲-۰/۸ میلی‌متر) و ویژگی ترکیبات اسپری شدند (جدول ۳).

**جدول ۳: مقدار عناصر غذایی موجود در غذای کوپنز (آنالیز شرکت)**

| مواد مغذی | مقدار ٪ mm۰/۸-۱/۲ |
|---|---|
| پروتئین | ٪۵۶ |
| چربی خام | ٪۱۵ |
| سلولز | ٪۰/۵ |
| خاکستر | ٪۸/۴ |
| فسفر | ٪۱/۴ |
| کلسیم | ٪۲/۳ |
| سدیم | ٪۰/۷ |
| رطوبت | ٪۹/۷ |
| سایر افزودنی ها | ٪۶ |

خوراک‌دهی روزانه تیمارها بر پایه دمای آب و زیست توده هر آکواریوم و در نظر گرفتن به زیست‌سنجی‌ها (Hamrang Omshi *et al*., 2017). ابتدا و میان دوره به میزان ۵-۳ درصد وزن توده زنده (Ghosh *et al*., 2008) (از ابتدا تا انتها دوره) در ۳ وعده صبح، ظهر و عصر در ساعات (۸، ۱۲ و ۱۶) به مدت ۷۰ روز انجام گرفت (جدول ۲).

۲۴ ساعت پس از پایان دوره پرورش قطع تغذیه جهت اطمینان کامل از دفع محتویات لوله گوارش، انجام شد و از ۳ قطعه بچه ماهی اسکار از هر آکواریوم از رگ‌های ناحیه دمی در پشت باله مخرجی و با استفاده از سرنگ انسولین خون‌گیری صورت گرفت.

بعد از گرفتن $2^{cc}$ خون، $0/5^{cc}$ به داخل تیوب‌های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون هپارین جهت انجام مطالعات شاخص‌های خونی و $1/5^{cc}$ باقیمانده به صورت مخلوط کردن



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]
[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

خون چند ماهی باهم[1] به داخل تیوب‌های اپندروف غیر هپارینه جهت انجام اندازه‌گیری آنزیم‌ها منتقل شد. خون موجود در لوله‌های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین با سانتریفوژ (مدل Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatch (آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس سرم جدا و با سمپلر به تیوپ‌های اپندورف انتقال و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شرکت Heraeus sepatch (آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس سرم جدا و با سمپلر به تیوپ‌های اپندورف انتقال و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای شمارش گلبول های قرمز، خون به نسبت ۱:۱۰۰ با یک رقیق کننده در یک لوله پلاستیکی اپندورف رقیق و به آرامی مخلوط شد. انتقال خون رقیق شده به یک محفظه هموسیتومتر پوشیده شده با شیشه پوششی با استفاده از لوله مویرگی هماتوکریت یا میکروپیپت انجام شد.

ابتدا قطرات دفع شدند و سپس دهانه مویرگی یا پیپت لبه شیشه پوشش را لمس کرد تا خون رقیق شده بتواند محفظه هموسیتومتر را به خودی خود با استفاده از نیروی مویرگی مایع، بدون حباب هوا پر کند. شمارش سلول ها با بزرگنمایی ۴۰۰ ×، پس از نشستن سلول‌ها در کف محفظه انجام شد.

هماتوکریت با روش میکروسانتریفیوژ با لوله‌های هپارین اندازه‌گیری شد (Witeska *et al.*, 2022). برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله‌ها در داخل میکروسانتریفوژ میکروهماتوکریت (مدل D-78532 Tuttlingen. شرکت Hettich (آلمان) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه قرار گرفت (Witeska *et al.*, 2022). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت‌هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین انجام گرفت. جذب نوری مخلوط را در اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS – ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و با استفاده از کیت پارس آزمون ساخت ایران و در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه گردید. حجم متوسط گلبول قرمز بر حسب واحد فمتولیتر (fl) از رابطه ۱ محاسبه شد (Witeska *et al.*, 2022):

$$MCV = \frac{Hematocrit}{RBC} \times 10$$ رابطه ۱:

غلظت متوسط هموگلوبین بر حسب پیکو گرم (pg) از رابطه ۲ محاسبه شد (Witeska *et al.*, 2022):

$$MCH = \frac{Hemoglobin}{RBC} \times 10$$ رابطه ۲:

میانگین غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز بر حسب درصد از رابطه ۳ به‌دست آمد (Witeska *et al.*, 2022).

$$MCHC = \frac{Hemoglobin}{Hematocrit} \times 100$$ رابطه ۳:

اندازه‌گیری آنزیم‌های گوارشی به روش تهیه سرم خون صورت گرفت. سنجش آلفاآمیلاز به روش از طریق رنگ‌سنجی کینتیک و به‌کارگیری کیت زیست‌شیمی (ساخت ایران) و با دستگاه اسپکتروفتومتر در محدوده خطی در طول موج ۴۰۵ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشخص و با استفاده از محلول‌های استاندارد، Substrate و Buffer سنجش شد (Schumann *et al.*, 2006). فعالیت لیپاز با مخلوط واکنش شامل Buffer، پروب DTNB و Substrate لیپاز تهیه شد و از طریق طیف سنجی در طول موج ۵۸۰ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (Ng, 2002). اندازه‌گیری پروتئاز در سوپرناتانت‌ها با روش سنجش اسپکترومتری با اندازگیری جذب اجزاء محلول اسیدی در ۲۷۵ نانومتر تعیین شد که مقدار تیروزین آزاد شده را نشان می‌دهد (Ou *et al.*, 2018). تک کلون‌های باکتریایی در۵۰ میلی‌لیتر محیط LB براس تلقیح شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با تکان دادن در دور ۱۸۰rpm برای ۲۴ ساعت انکوبه و نمونه‌ها در ۸۰۰۰g× برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۴۵۰ میکرولیتر محلول واکنش حاوی ۱٪ کازئین در بافر ۵۰ میلی مولار گلایسین (NaOH) با pH=۱۰ اضافه شد و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰دقیقه انکوبه گردید.

آنالیز آماری پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها براساس نتایج حاصل از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) انجام شد. پس از انجام آزمون همگن بودن واریانس[2] از آزمون دانکن (Duncan) استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار (SPSS) ویرایش ۲۳ استفاده شد.

[1] Pulling

[2] Test of Homogeneity of Variances



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

## نتایج

طبق آزمون تجزیه واریانس یکطرفه میانگین نتایج حاصل از فاکتورهای خونی این بررسی نشان داد، افزودن باکتری *Bacillus subtilis* و *Lactococcus lactis* در جیره غذایی بچه ماهی اسکار منجر به افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۳ ($LL_{450}$)، نسبت به سایر تیمارها و تیمار شاهد با اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). اما در فاکتور متوسط حجم گلبول‌های قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین با توجه به افزایش عددی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد (جدول ۴).

**جدول ۴: شاخص‌های خونی ماهی اسکار در تیمارهای آزمایشـــی در پایان ۷۰ روز تغذیه از باکتری *B.subtilis***

| تیمار | گلبول‌های قرمز (mm3) | هموگلوبین (g/dL) | هماتوکریت (%) | MCV (Fl) | MCH (pg) | MCHC (g/dL) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۱۴۸۰۰۰۰ ± ۲۵۱۶۶/۱۱$^{c}$ | ۵/۵۳ ± ۰/۰۸۸$^{c}$ | ۲۵/۵۳ ± ۰/۳۳$^{c}$ | ۱۷۰/۶۷ ± ۰/۸۸ | ۳۷/۱۰ ± ۰/۳۲ | ۲۱/۸۳ ± ۰/۱۲ |
| $LL_{150}$۱ | ۱۵۵۰۰۰۰ ± ۴۱۷۶۶/۵۵$^{bc}$ | ۵/۷۷ ± ۰/۱۴$^{bc}$ | ۲۶/۳۳ ± ۰/۶۷$^{bc}$ | ۱۷۰ ± ۰/۵۸ | ۳۷/۳۰ ± ۰/۴۶ | ۲۱/۸۷ ± ۰/۲۴ |
| $LL_{300}$۲ | ۱۵۳۰۰۰۰ ± ۳۵۱۱۸/۸۵$^{bc}$ | ۵/۷۳ ± ۰/۱۲$^{bc}$ | ۲۶ ± ۰/۵۸$^{bc}$ | ۱۶۹/۶۷ ± ۱/۸۵ | ۳۷/۴۰ ± ۰/۱۵ | ۲۲/۰۳ ± ۰/۱۴ |
| $LL_{450}$۳ | ۱۶۸۰۰۰۰ ± ۲۰۸۱۶/۶۷$^{a}$ | ۶/۳۶ ± ۰/۱۲$^{a}$ | ۲۹ ± ۰/۵۸$^{a}$ | ۱۷۲ ± ۱/۵۲ | ۳۷/۸۳ ± ۰/۲۴ | ۲۱/۹۳ ± ۰/۱۲ |
| $BS_{150}$۴ | ۱۳۹۰۰۰۰ ± ۲۰۸۱۶/۶۶$^{d}$ | ۵/۱۳ ± ۰/۰۳$^{d}$ | ۲۳/۶۷ ± ۰/۳۳$^{d}$ | ۱۷۰ ± ۰/۵۸ | ۳۶/۹۰ ± ۰/۵۳ | ۲۱/۶۳ ± ۰/۲۶ |
| $BS_{300}$۵ | ۱۴۸۰۰۰۰ ± ۱۴۵۲۹/۶۶$^{c}$ | ۵/۵۰ ± ۰/۰۶$^{c}$ | ۲۵/۳۳ ± ۰/۳۳$^{c}$ | ۱۷۰/۳۳ ± ۱/۲۰ | ۳۷ ± ۰/۰۶ | ۲۱/۷۰ ± ۰/۱۵ |
| $BS_{450}$۶ | ۱۵۹۰۰۰۰ ± ۲۶۵۴۷/۵۱$^{b}$ | ۵/۹۰ ± ۰/۰۶$^{b}$ | ۲۷ ± ۰/۵۸$^{b}$ | ۱۶۹ ± ۱ | ۳۷/۰۶ ± ۰/۲۸ | ۲۱/۸۳ ± ۰/۲۶ |
| $MIX_{150}$۷ | ۱۵۰۰۰۰۰ ± ۲۶۶۶۶/۶۷$^{c}$ | ۵/۷۰ ± ۰/۱$^{bc}$ | ۲۵/۶۷ ± ۰/۳۳$^{bc}$ | ۱۷۱/۶۷ ± ۰/۶۷ | ۳۸/۱۳ ± ۰/۶۷ | ۲۲/۱۷ ± ۰/۳۳ |
| $MIX_{300}$۸ | ۱۵۰۰۰۰۰ ± ۲۱۸۵۸/۱۳$^{bc}$ | ۵/۷۳ ± ۰/۰۹$^{bc}$ | ۲۶/۳۳ ± ۰/۳۳$^{bc}$ | ۱۷۲/۳۳ ± ۰/۳۳ | ۳۷/۵۰ ± ۰/۱۲ | ۲۱/۷۳ ± ۰/۱۲ |
| $MIX_{450}$۹ | ۱۴۷۰۰۰۰ ± ۳۰۵۵۰/۵۰$^{cd}$ | ۵/۵۳ ± ۰/۰۹$^{c}$ | ۲۵/۳۳ ± ۰/۳۳$^{c}$ | ۱۷۱/۶۷ ± ۱/۴۵ | ۳۷/۶۰ ± ۰/۴۰ | ۲۱/۸۳ ± ۰/۱۲ |

اعداد بدون حروف نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن شاخصه‌هاست (Mean ± D.S).

بر اساس نتایج میزان آنزیم آمیلاز خون در تیمارهای۲ ($LL_{300}$) و ۳ ($LL_{450}$) و ۸ ($MIX_{300}$) و ۹ ($MIX_{450}$) افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). همچنین میزان آنزیم لیپاز خون در تیمارهای ۲ ($LL_{300}$) و ۳ ($LL_{450}$) و ۸ ($MIX_{300}$) و ۹ ($MIX_{450}$) افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). بر اساس نتایج میزان آنزیم پروتئاز خون در تیمار ۹ ($MIX_{450}$) افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$) (جدول ۵).

**جدول ۵: میانگین آنزیم های گوارشی روده ماهی اسکار در تیمارهای آزمایشـــی و شاهد در پایان ۷۰ روز تغذیه با *L.lactis* و *B.subtilis* و مخلوط باکتری (U/l)**

| تیمار | آمیلاز | لیپاز | پروتئاز |
|---|---|---|---|
| شاهد | ۳۴/۵ ± ۰/۵$^{bc}$ | ۱۷/۵ ± ۰/۵$^{c}$ | ۲۵/۵ ± ۰/۵$^{d}$ |
| $LL_{150}$۱ | ۳۴/۵ ± ۰/۵$^{bc}$ | ۲۰ ± ۱/۰$^{ab}$ | ۲۶ ± ۱/۰$^{cd}$ |
| $LL_{300}$۲ | ۴۱/۵ ± ۳/۵$^{a}$ | ۲۳ ± ۱/۰$^{a}$ | ۲۹ ± ۱/۰$^{abcd}$ |
| $LL_{450}$۳ | ۴۱ ± ۲/۰$^{a}$ | ۲۲ ± ۱/۰$^{a}$ | ۳۰/۵ ± ۱/۵$^{abcd}$ |
| $BS_{150}$۴ | ۳۶/۵ ± ۱/۵$^{b}$ | ۱۸/۵ ± ۰/۵$^{b}$ | ۲۷ ± ۱/۰$^{bcd}$ |
| $BS_{300}$۵ | ۳۸ ± ۱/۰$^{ab}$ | ۲۱/۵ ± ۱/۵$^{a}$ | ۳۰ ± ۱/۰$^{ab}$ |
| $BS_{450}$۶ | ۳۹ ± ۲/۰$^{ab}$ | ۲۱/۵ ± ۰/۵$^{a}$ | ۲۹ ± ۱/۰$^{abcd}$ |
| $MIX_{150}$۷ | ۳۴ ± ۱/۰$^{c}$ | ۲۰/۵ ± ۰/۵$^{ab}$ | ۲۵/۵ ± ۰/۵$^{d}$ |
| $MIX_{300}$۸ | ۴۲ ± ۳/۰$^{a}$ | ۲۲/۵ ± ۰/۵$^{a}$ | ۲۹/۵ ± ۱/۵$^{abc}$ |
| $MIX_{450}$۹ | ۴۱ ± ۳/۰$^{a}$ | ۲۳ ± ۱/۰$^{a}$ | ۳۱ ± ۱/۰$^{a}$ |

اعداد با حروف غیر مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف میان آنهاست ($P<0.05$). (Mean ± D.S).



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

## بحث

پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی میکروبی زنده از طریق ایجاد تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی در میزبان ایجاد می‌کنند (Hasaninia *et al.*, 2022). گلبول های قرمز فراوان ترین سلول های خونی در ماهی هستند. آنها معمولاً ۹۹-۹۸ درصد از کل سلول‌های خونی این حیوانات را تشکیل می دهند. شمارش گلبول‌های قرمز به عنوان یک فراسنجه مهم تشخیصی، به عوامل محیطی مختلفی مانند دمای آب بستگی دارد (Paul *et al.*, 2019) و می‌تواند از طریق بسیاری از عوامل زیستی شامل فعالیت ماهی، سن، جنس، وضعیت تغذیه‌ای و وضعیت تولید مثل تعدیل شود و حتی در جمعیت‌های مختلف یک گونه متفاوت باشد. گلبول‌های قرمز معمولاً از $\mu L/$ $۱۰^{۶}\times۱/۵-۰/۵$ در گونه های کمتر فعال تا $\mu L/$ $۱۰^{۶}\times۴/۲-۳$ در گونه‌های فعال‌تر متغیر است (Witeska *et al.*, 2022).

در این تحقیق گلبول‌های قرمز در تیمار ۳ ($LL_{450}$) دارای افزایش معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها و شاهد بوده است. در ماهی تیلاپیا نیل با استفاده از باکتری *Micrococcus luteus* ، به بالا رفتن تعداد گلبول‌های قرمز در واحد حجم خون اشاره شده است (Abd El-Rhman, *et al.*, 2009). در جمع‌بندی گزارش‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها در گونه‌های زیادی ماهیان و در شرایط متفاوت افزایش قابل‌توجه تعداد گلبول‌های قرمز به صراحت به عنوان یکی از اثرات مفیدپروبیوتیک‌ها معرفی شده است (Bidhan *et al.*, 2013). افزایش گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین را شدت می‌بخشد و در نهایت منجر به بالا رفتن ظرفیت اکسیژن در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک می‌شود. نتایج بررسی هموگلوبین و هماتوکریت خون این تحقیق در تیمار ۳ ($LL_{450}$) افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد. مشابه این تحقیق ثرات پروبیوتیک پروتکسین بر شاخصه‌های خونی ماهی اسکار، بیشترین غلظت هموگلوبین و گلبول‌های قرمز را در تیمارهای حاوی باکتری نشان داد (Firouzbakhsh *et al.*, 2011). افزایش میزان هموگلوبین و گلبول قرمز نسبت به شاهد، نشان‌دهنده اثر مثبت پروبیوتیک در تولید سلول‌های جوان بیشتر است (Dias *et al.*, 2020). با توجه به این‌که تقریباً تمامی اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می گردد، به هموگلوبین موجود در گلبول قرمز خون متصل است (Nelson and Cox, 2021). از این‌رو، شباهت نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول قرمز، دارای رابطه‌ای منطقی است. همچنین Raida و همکاران (۲۰۰۳) و Newaj-Fyzul و همکاران (۲۰۰۷) برای قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) به عنوان گونه‌ای که نیاز به ظرفیت بالای اکسیژنی دارد و نیز Danielle و همکاران (۲۰۰۹) برای گونه *Lithobates catesbeianus* نتایج مشابهی را گزارش کردند. نتایج متضادی از عدم تاثیر استفاده منفرد یا ترکیبی پروبیوتیک‌ها در تغذیه قزل آلای رنگین کمان هم حاصل شده است که دلایل آن را به طول دوره مصرف و نیز ویژگی‌های محیطی پرورش ذکر نموده‌اند. هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز است و رابطه مستقیم با آن دارد (Vazirzadeh *et al.*, 2020). نتایج به‌دست آمده حاکی از این است که مقادیر شاخص‌های مذکور در تیمارهای حاوی پروبیوتیک بیشتر از گروه شاهد بود که بیانگر برتری وضعیت تنفس در این تیمارها نسبت به شاهد است. از سوی دیگر، در صورت وجود عوامل بیماری‌زا در بدن یا به‌هم خوردن تعادل تراکم مواد معدنی در خون، درصد هماتوکریت تغییر می‌کند. بنابراین، اگر تغییرشاخص هماتوکریت که بیانگر احتمال وجود شرایط محیطی نامساعد باشد (Yang *et al.*, 2018; Lall and Kaushik, 2021). کاهش حجم گلبول‌های قرمز نشان‌دهنده فقدان التهاب است که سبب تسهیل حرکت و تعلیق گلبول‌های قرمز می‌شود (Soulivongsa *et al.*, 2021). در پژوهش حاضر، عدم افزایش حجم گلبول‌های قرمز خون اسکار در تیمارها نشان‌دهنده عدم تاثیر منفی به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی اسکار نیز بوده است.

نتایج حاصل از یافته‌های این تحقیق در خصوص آنزیم‌های گوارشی روده‌ای آمیلاز، لیپاز و پروتئاز خون نشان داد که در بین تیمارهای دریافت‌کننده باکتری میزان آنزیم آمیلاز و لیپاز خون در تیمارهای ۲ ($LL_{300}$) و ۳ ($LL_{450}$) و ۸ ($MIX_{300}$) و ۹ ($MIX_{450}$) و آنزیم پروتئاز خون در تیمار ۹ ($MIX_{450}$) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها دارد. نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌هایی است که معتقدند مکمل *B. subtilis* می‌تواند فعالیت آنزیم گوارشی ماهی تیلاپیای نیل را تقویت کند و عملکرد رشد ماهی را بهبود بخشد (Liu *et al.*, 2017). پژوهش‌های پیشین نیز نشان‌دهنده افزایش جذب غذا و روند هضم آنزیم و بهبود بافت روده در گونه‌های پرورشی از



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

جمله کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Yanbo and Zirong, 2006)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Hamza *et al*., 2016) و کپور جاوا (*Puntius gonionotus*) (Allameh *et al*., 2017) ، تیلاپیای نیل (Liu *et al*., 2017) و اسکار (Hasaninia *et al*., 2022) است. بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک حاوی آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز، لیپاز و پروتئاز هستند که از طریق تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی باعث تقویت تغذیه میزبان می‌شوند (Assan *et al*., 2022). نتایج این مطالعه حاکی از افزایش آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در تیمارهای حاوی باکتری به‌ویژه تیمار ۹ ($MIX_{450}$) نسبت به شاهد بوده که این امر نشان‌دهنده تاثیر باکتری‌های افزوده شده به جیره بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی اسکار است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن پروبیوتیک *B. subtilis* و *L. lactis* و مخلوط دو باکتری در جیره غذایی ماهی اسکار منجر به افزایش عددی تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین، درصد هماتوکریت، در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به شاهد شد. همچنین در بهبود آنزیم‌های گوارشی روده در جیره‌های غذایی حاوی باکتری موثر بوده است و می‌تواند به عنوان یک پروبیوتیک مطرح باشد. همچنین به عنوان یکی از یافته‌های فرعی این پژوهش باید به این نکته اشاره کرد که تکنیک نمونه‌برداری و اندازه‌گیری آنزیم‌های دستگاه گوارش متفاوت از سایر روش‌های نمونه‌برداری که مستلزم کشتن و جدا نمودن دستگاه گوارش است، به‌خوبی و بدون از بین بردن ماهی توانست تغییرات آنزیمی حاصل از مصرف پروبیوتیک‌ها را نشان دهد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارشناس محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری آقای مهندس جلیل جلیل‌پور که در تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

**Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E. and Shalaby, A.M.E., 2009.** *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2), 175–180. https://Doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020.

**Allameh, S.K., Ringø, E., Yusoff, F.M., Daud, H.M. and Ideris, A., 2017.** Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese Carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquaculture Nutrition*, 23, 331–338. https://doi.org/10.1111/anu.12397

**Assan, D., Kuebutornye, F.K.A., Hlordzi, V., Chen, H., Mraz, J., Mustapha, U.F. and Abarike, E.D., 2022.** Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 257, 110653. Doi: 10.1016/j.cbpb.2021.110653

**Bidhan, C.D., Meena, D.K., Behera, B.K., Das, P., Das Mohapatra, P.K. and Sharma, A.P., 2013.** Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3):921-71. Doi: 10.1007/s10695-013-9897-0

**Danielle, C.D., Marta, V.S., ClaŁudia, M.F., Fernanda, M.F., Maria, J.T.R. and Antenor, A.S., 2009.** Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 41(7), 1064–1071. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x.



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]
[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

**Dias, D.C., Tachibana, L. Iwashita, M.K.P., Nakandakare, I.B., Romagosa, E., Seriani, R., Tavares Ranzani-Paiva, M.J., 2020.** Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Biotecnologia*. http://www.periodicos.uem.br/ojs/ ISSN on-line: 1807-863X. Doi:10.4025/actascibiolsci. v42i1.52473

**Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K., 2011.** Effects of a probiotic, Protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Journal of Aquatic Biology*, 10, 6, pp. 438-50, Doi:10.22034/ijab. v10i6.1753.*Physiology and Biochemistry*, 37(4), 833–42. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9481-4.

**Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C., 2008.** Dietary probiotic supplementation on growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, 14(4), pp. 289–299. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00529.x

**Hamrang Omshi, A., Bahri, A., Khara, H. and Mohammadizadeh, F., 2017.** The effects of Lucantin red, yellow and Astaxanthin on growth, hematological, immunological parameters and coloration in the Tiger Oscar (*Astronotus ocellatus* Aga ssiz,1831). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18, 4, pp. 798–811.

**Hamza, A., Fdhila, K., Zouiten, D. and Masmoudi, A.S., 2016.** *Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis* as probiotics in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), pp. 495–507. https://doi.org/10.1007/s10695-015-0154-6

**Hasan, K.N. and Banerjee, G., 2020.** Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: A review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 1-16. https://doi.org/10.1186/s41936-020-00190-y.

**Hasaninia, A., Vahabzadeh Roudsari, H., Khara, H., Shenavar Masouleh, A. and Ahmadnezhad, M., 2022.** Effect of Dietary *Lactococcus lactis* and *Bacillus subtilis* on the innate immunity, intestinal microbiota, histometrical indices, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in Oscar, *Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831". *International*

**Lall, S.P. and Kaushik, S.J., 2021.** Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals: An open access Journal from MDPI*, 11(9), 2711. https://doi.org/10.3390/ani11092711.

**Li, Y., Yang, Y., Song, L., Wang, J., Hu, Y., Yang, Peng Cheng, Q. and Li, J., 2021.** Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on growth performance, survival, immune response, antioxidant capacity and digestive enzyme activity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture and Fisheries*, 6, 3, pp. 283-288, ISSN 2468-550X, https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.10.006.

**Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W. and Zhou, Y., 2017.** Dietary administration of *Bacillus*



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

*subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 60, pp. 326–333. Doi: 10.1016/j.fsi.2016.12.003.

**Marlianingrum, P.R. and Suhana, Suprata, I., 2022.** Ornamental fish export during the Covid-19 pandemic. *AACL Bioflux*, 15, 6, 2999-3011. http://www.bioflux.com.ro/aacl.

**Naiel, M.A.E.M., Shehata, A.M., El-Kholy, A.I., El-Naggar, K., Farag, M.R. and Alagawany, M., 2022.** The mitigating role of probiotics against the adverse effects of suboptimal temperature in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 550, 737877. ISSN 0044-8486. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737877

**Nelson, D.L. and Cox M.M., 2021.** Principles of Biochemistry (Lehninger Principles of Biochemistry) 8th Edition, Kindle Edition. 4819P.

**Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B., 2007.** *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp. 1699–1706. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03402. x.

**Ng, V., 2002.** *Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests*, 4th Edition, Vol. 1 and 2. D.S. Young and R.B. Friedman, eds. Washington, DC: AACC Press, *Clinical Chemistry*, 48, 4, pp. 682–683. https://doi.org/10.1093/clinchem/48.4.682a.

**Ou, Y., Wilson, R.E. and Weber, S.G., 2018.** Methods of Measuring Enzyme Activity Ex Vivo and in Vivo. *Annual Review of analytical Chemistry* (Palo Alto, Calif.), 11(1), 509–533. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-125619.

**Paul, T., Shukla, S.P., Kumar, K., Poojary, N. and Kumar, S., 2019**. Effect of temperature on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878): Hematology, biochemistry and genotoxicity evaluation. *Science of the Total Environment*, 668, 104–114. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.443.

**Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E. and Buchmann, K., 2003.** Enhanced resistance of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*, 26(8), pp. 495–498. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00480.x

**Safari, O. and Mehraban, M., 2013.** Study on the effects of probiotic, *Pediococcus acidilactici* in the diet on some biological indices of Oscar (*Astronauts ocellatus*). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4, 11, pp. 3458–3464. www.irjabs.com

**Schumann G., Aoki R., Ferrero, C.A., Ehlers, G., Ferard, G., Gella, F.J., Jørgen Jørgensen, P., Kanno, T., Kessner, A., Klauke, R., Kytzia, H.J., Lessinger, J.M., Miller, W.G., Nagel, R., Pauwels, J., Schimmel, H., Lothar**



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

**Siekmann, Weidemann, G., Yoshida, K., Ceriotti, F., 2006.** IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(9): 1146-1155. Doi: 10.1515/CCLM.2006.212.

**Soulivongsa, L., Tengjaroenkul, B., Patawang, I. and Neeratanaphan, L., 2021.** Cytogenetic, Serum Liver Enzymes and Liver Cell Pathology of the Hampala Barb Fish (*Hampala macrolepidota*) Affected by Toxic Elements in the Contaminated Nam Kok River Near the Sepon Gold-Copper Mine, Lao PDR. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5854. https://Doi.org/10.3390/ijerph18115854

**Vazirzadeh, A., Roosta, H., Masoumi, H., Farhadi, A. and Jeffs, A., 2020.** Long-term effects of three probiotics, singular or combined, on serum innate immune parameters and expressions of cytokine genes in rainbow trout during grow-out. *Fish & Shellfish Immunology*, 98, pp. 748-757. ISSN:1050-4648, https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.023.

**Whittington, R.J. and Chong, R., 2007.** Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 81, 1-3, pp. 92–116.https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.04.007.

**Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K. and Bojarski, B., 2022.** Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture*, 547, 737498. ISSN 0044-8486. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737498.

**Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W.J., Kong, I.S. and Bai, S.C., 2020.** Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on Growth, Immune Responses, Histology and Gene Expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8(1), 0. https://doi.org/10.3390/microorganisms8010067.

**Yanbo, W. and Zirong, X., 2006.** Effect of probiotics for Common Carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 3–4, pp. 283–292. http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003

**Yang, S., Du, J., Duan, Y. L., Xiao, Q., Li, N., Lin, Q., Zhao, L. Du, Z., Zhou, J., and Du, J., 2018.** Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. *BMC Microbiology*, 18:113 https://doi.org/10.1186/s12866-018-1237-1



[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]

# Effects of diets containing *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* bacteria on cellular hematology and digestive enzymes of tiger Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831)

Hasaninia A.[1]; Vahabzadeh Roudsari H.[1*]; Khara H.[1]; Shenavar Masouleh A.R.[2]; Ahmadnezhad M.[3]

*habib.vahabzadeh@gmail.com

1-Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
2-International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht- Iran.
3-Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Anzali, Iran.

## Abstract

Oscar fish (*Astronotus ocellatus*), is one of the most popular aquarium fish, which needs more attention to provide health in breeding conditions. Due to the expansion of the use of probiotic bacteria in the aquaculture industry this research was conducted to evaluate the effects of *Lactococcus lactis* and *Bacillus subtilis* on digestive enzymes and hematology as health indices of Oscar. The experiment was set up with 300 juveniles with an average weight of 8.96 ± 0.03 (gr) and a length of 8.23 ± 0.02 (cm) during 70 days with a diet containing the two mentioned bacteria in 9 treatment groups of CFU/g $10^{10}$ bacterial concentration as 150, 300 and 450 mg added bacteria per kg of food and equal mixtures of both bacteria as 75, 150 and 225 mg per kg of food and were compared with control treatment. At the end of rearing period the results of the blood indices showed an increase in red blood cells, hemoglobin and hematocrit values in treatment 3 ($LL_{450}$) ($P<0.05$). Also, the results of the activity of digestive enzymes, including amylase, lipase and protease, in the treatments receiving bacterial added diets, especially in treatment 3 ($LL_{450}$), statistically was differing from control ($P<0.05$).

**Keywords:** Probiotics, Oscar, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, digestive enzymes, blood cells

[ Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-13 ]

[ DOR: 20.1001.1.24234575.1402.10.1.1.9 ]