شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۳۱۵-۳۰۳

اثرات نانو ذرات آهن به همراه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بر آنزیم‌های گوارشی و فلور میکروبی روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سعید ضیایی‌نژاد[۱]*، ناصر بنی‌صالح[۲]، علی آبرومند[۱]، احمد تقوی مقدم[۳]

۱.دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان، ایران

۲.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان، ایران

۳.دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی (شعبه اهواز)، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۶

چکیده

این تحقیق با هدف مطالعه اثرات نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس برفعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور میکروبی روده ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) اجرا گردید. بدین منظور تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی ۵±۴۰ گرم با ۶ جیره غذایی آزمایشی با سطوح مختلف نانو ذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس تغذیه شدند که شامل، تیمار ۱ (گروه شاهد) (غذای تجاری بدون افزودن هرگونه نانو ذرات آهن و پروبیوتیک)، تیمار ۲ (غذای تجاری حاوی 10^8 CFU/g پروبیوتیک)، تیمار ۳ (غذای تجاری حاوی ۰/۲۵ نانو ذرات آهن)، تیمار ۴ (غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ mg/g میلی‌گرم /گرم نانو ذرات آهن)، تیمار ۵ (غذای تجاری حاوی ۰/۲۵ mg/g میلی‌گرم /گرم نانو ذرات آهن به همراه 10^8 CFU/g پروبیوتیک) و تیمار ۶ (غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ میلی‌گرم /گرم نانو ذرات آهن به همراه 10^8 CFU/g پروبیوتیک) بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از نانو ذرات آهن و پروبیوتیک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین، فسفاتاز قلیایی، پروتئاز و لیپاز بطور معنی‌دار تاثیر افزایشی داشت ($P<0/05$). نتایج سنجش باکتریایی روده ماهی نشان داد که ضمن اینکه در تیمارهای پروبیوتیکی، لاکتوباسیل‌ها فلور غالب را به خود اختصاص دادند، افزودن نانو ذارت آهن نیز باعث افزایش تعداد کل باکتری‌های روده گردید. آنچه می‌توان بطور کل نتیجه گرفت اینکه افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور در اثر افزودن نانو ذرات آهن و پروبیوتیک در کنار استقرار در دستگاه گوارش ماهی طبیعتا خواهد توانست شرایط بهتری را برای رشد ماهی فراهم آورد و فاکتورهای تغذیه‌ای را بهبود دهد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات آهن، پروبیوتیک، آنزیم گوارشی، فلور میکروبی، ماهی کپور.

* نویسنده مسئول: سعید ضیایی نژاد
Email: zbsaeed@yahoo.com

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 2, Summer 2022
pp. 303-315

Effects of iron nanoparticles with *Lactobacillus* probiotic on digestive enzymes and intestinal microbial flora of common carp (*Cyprinus carpio)*

Saeed Ziaei-nejad[1*], Naser Banisaleh[1], Ali Abroumand[1], Ahmad Taghavi Moghadam[2]

1. *Associate professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran*
2. *MSc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.*
3. *Associate professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Ahvaz Branch), Ahvaz, Iran*

Received: 23-Dec-2021 **Accepted: 05-Apr-2022**

Abstract
The aim of this study was to investigate the effects of iron nanoparticles and the *Lactobacillus* probiotic on the activity of digestive enzymes and the intestinal microbial flora of the common carp (*Cyprinus carpio*). For this purpose, 180 carp with an average weight of 40±5 g were fed with 6 experimental diets with different levels of iron nanoparticles and *Lactobacillus*, including: treatment 1 (control group) (commercial food without adding any iron nanoparticles and probiotics), treatment 2 (commercial food containing 10^8 CFU/g probiotics), treatment 3 (commercial food containing 0.25 mg/g iron nanoparticles), treatment 4 (commercial food containing 0.50 mg/g iron nanoparticles), treatment 5 (Commercial food containing 0.25 mg/g iron nanoparticles with 10^8 CFU/g probiotics) and treatment 6 (commercial food containing 0.50 mg/g iron nanoparticles with 10^8 CFU/g probiotics). The results of this study showed that the use of iron nanoparticles and *Lactobacillus* probiotic had a significant increase in the activity of digestive enzymes alpha amylase, trypsin, chymotrypsin, alkaline phosphatase, protease and lipase ($P < 0.05$). The results of bacterial analysis of fish intestine showed that while in probiotic treatments, Lactobacilli occupied the dominant flora, the addition of iron nanoparticles also increased the total number of intestinal bacteria. What can be concluded in general is that increasing the activity of carp digestive enzymes by adding iron nanoparticles and probiotics along with its establishment in the fish digestive tract will be able to provide better conditions for fish growth and improve nutritional factors.

Keywords: Iron nanoparticles, Probiotics, Digestive enzyme, Microbial flora, Carp

Corresponding author: Saeed Ziaei-nejad Email: zbsaeed@yahoo.com

۱. مقدمه

صنعت آبزی پروری در سطح جهانی از نظر تنوع گونه‌ای و افزایش تراکم و پرورش در حال گسترش است و هدف از آبزی پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید، برای بهینه سازی سودآوری می‌باشد (Denev و همکاران، ۲۰۰۹). همواره یکی از بزرگترین مسائل پیش رو در صنعت آبزی پروری، یافتن راه حل‌هایی جهت بالا بردن تولید است و لذا بررسی فناوری‌های جدید روی گونه‌های پرورشی مرسوم، جهت بالا بردن توان تولید و بازماندگی، رسیدن به این هدف را نزدیک تر و متمرکز تر می‌کند. در طول دو دهه گذشته تحقیقات و تجربیات عملی نشان داد که با کمک دو فناوری میکروبی (استفاده از پروبیوتیک‌ها) و نانوتکنولوژی (استفاده از مواد در ابعاد نانو) می‌توان گام‌های موثری در جهت افزایش راندمان در بخش آبزی پروری برداشت، با این حال تحقیقات تلفیقی بسیار کمی در رابطه با اثرات هم افزایی این دو فناوری انجام شده است.

یکی از ایده‌ها در خصوص پروبیوتیک‌ها، بهبود مناسب جمعیت میکروبی میزبان بوده که از طریق دستکاری جمعیت باکتری در آبزیان از طریق غنی سازی، اضافه کردن باکتری‌های پروبیوتیکی به آب محیط پرورشی آبزیان و تلقیح برخی از ترکیبات طبیعی به جیره غذایی آبزیان جهت افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیکی صورت می‌گیرد. آهن یکی از ترکیباتی است که علاوه بر نقش آن در فعالیت‌های حیاتی آبزیان، می‌تواند باعث تحریک رشد در باکتری‌ها گردد و دسترسی به آهن، موضوعی کلیدی در تشکیل میکروفلور ماهیان است (Ringo and Gatesoupe, 1998).

رقابت برای جذب آهن یکی از عمده ترین انواع رقابت بین میکروارگانیسم‌ها است. عملاً تمام میکروارگانیسم‌ها برای رشد به آهن نیاز دارند (Reid *et al*., 1993). در واقع سیدروفورها عوامل اختصاصی چنگالی نمودن آهن فریک هستند که وزن مولکولی کمی (کمتر از ۱۵۰۰ کیلو دالتون) دارند (Neilands, 1981) و می‌توانند آهن رسوب یافته را حل نموده و آن را برای رشد میکروب‌ها قابل استفاده نمایند. اهمیت سیدروفورها در به دام انداختن مواد مغذی از محیط و محفوظ نگه داشتن آنها از دست رقیبان است. از این‌رو اهمیت اکولوژیکی سیدروفورها در این است که باکتری‌ها را قادر می‌سازند تا از مواد غذایی ضروری استفاده نمایند و سایر میکروارگانیسم‌های رقابت کننده را بی‌نصیب گذاشته و آنها را از رقابت خارج کنند. از سوی دیگر خود نانو ذرات آهن تاثیرات مستقیمی بر فاکتورهای رشد و بازماندگی آبزیان دارد. Akbary و Jahanbakhshi (۲۰۱۹) تاثیر مثبت نانو ذرات آهن را بر فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای ماهی گلدفیش نشان دادند. این تاثیر مثبت در تحقیق دیگری در مورد ماهی قزل آلا نیز گزارش شده است (Ghobadi *et al*., 2017).

تحقیقات متعددی اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی آبزیان و بهبود شرایط تغذیه‌ای آنها را نشان داده است(Ziaei-nejad, *et al*., 2006; Wang and Xu, 2006; Suzer *et al*., 2008; *Thongprajukaew, et al*. 2011; Ramos *et al*., 2017)، اما تاثیر همزمان پروبیوتیک‌ها به همراه آهن به عنوان عامل محرک رشد باکتریایی بر فیزیولوژی دستگاه گوارش ماهیان پرورشی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. البته این تاثیر با رویکرد مثبت بر بهبود برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی قبلا توسط Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۲۱) گزارش شده است. لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر توام پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و نانو ذرات آهن بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی برنامه‌ریزی و اجرا گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تیماربندی و ذخیره‌سازی

کلیه مراحل عملی تحقیق حاضر به مدت ۹۰ روز در دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان دانشکده منابع

طبیعی انجام گردید. پس از آماده‌سازی، شستشو و ضد عفونی کردن مخازن، ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۴۰±۵ گرم به صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری دارای هوادهی مناسب توزیع گردیدند (به ازای هر مخزن ۱۵ قطعه ماهی). جهت تأمین آب از منبع آب شهری استفاده گردید.

جدول ۱-ترکیب بیوشیمیایی جیره غذای تجاری مورد استفاده

نوع ترکیبات	میزان(درصد)
پروتئین خام	۳۷-۳۵
رطوبت	کمتراز ۱۰
خاکستر	کمتراز ۱۰
چربی	۹- ۱۱
انرژی خام	۳۵۰۰
فیبر خام	۵

جدول ۲-تیمارهای غذایی آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق

تیمار	نوع غذا
۱	فاقد مکمل پروبیوتیکی و نانو ذرات آهن (تیمار شاهد)
۲	غذای تجاری حاوی 10^8 CFU/g پروبیوتیک
۳	غذای تجاری حاوی ۲۵ mg/g/ نانوذرات آهن
۴	غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ mg/g نانوذرات آهن
۵	غذای تجاری حاوی ۰/۲۵ mg/g نانو ذرات آهن به همراه 10^8 CFU/g پروبیوتیک
۶	غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ mg/g نانو ذرات آهن به همراه 10^8 CFU/g پروبیوتیک

۲.۲. پروبیوتیک و نانو ذرات آهن مورد استفاده

پروبیوتیک تجاری مورد استفاده در این مطالعه (شرکت ارجان زیست یار، ایران) شامل باکتری *Lactobacillus plantarum* بود. زنده ماندن این باکتری با کشت و شمارش آنها در محیط کشت MRS آگار تعیین شد (Zhang *et al*., 2019). رقت‌های سریالی نمونه‌های پروبیوتیک تهیه شد. از هر رقت، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت MRS آگار (Quelab) پخش شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شیشه‌های بی هوازی حاوی کیسه گاز (مرک، آلمان) انکوبه شد. این پروبیوتیک به میزان CFU/g $۱۰^۸$ به غذای ماهی افزوده شد (Kazuń et al., 2018).

نانو پودر اکسید آهن (Fe_2O_3) با خلوص ۹۸ درصد و اندازه ذرات متوسط ۲۰-۴۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد (مشهد، ایران) خریداری شد. به منظور تهیه محلول نانو ذرات آهن، پس از رقیق شدن نانو پودر اولیه در آب مقطر دوبار تقطیر، سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت (Tavana *et al*., 2014) و سپس سوسپانسیون نانو ذرات آهن برای بدست آوردن سوسپانسیون همگن به مدت ۱ ساعت در شیکر قرار داده شد (Ziaei-nejad *et al*., 2015). این نانو ذره به میزان ۰/۲۵ و ۰/۵۰ میلی‌گرم در گرم به غذای ماهی افزوده شد (Akbari and Jahanbakhshi, 2019). بر اساس مطالعه Mashjoor و همکاران (۲۰۱۸) نانو ذرات اکسید آهن حتی در بالاترین غلظت‌ها (۲۰۰۰-۱۰۰۰ میلی‌گرم) فاقد اثرات سمیت حاد بر بقاء بچه ماهیان کپور معمولی است (تلفات کمتر از ۱۰ درصد). بنابراین چون سمیت حاد با غلظت کشنده میانی (LC_{50} 96h) این نانو ذرات برای

کپور معمولی بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم است، می توان آن را جز مواد غیر سمی در نظر گرفت (UN, 2009).

۲.۳. آماده‌سازی جیره‌های غذایی

غذای پرواری مورد استفاده در این مطالعه از شرکت تعاونی نقشین کرمانشاه (جدول ۱) تهیه شد. این غذا جهت آماده سازی غذای تیمارهای مورد مطالعه در ابتدا به وسیله آسیاب پودر گردید. به منظور اضافه کردن پروبیوتیک و نانو ذرات آهن به جیره‌های آزمایشی، میزان مورد نیاز به غذای تجاری پودر شده اضافه شد. پس از مخلوط کردن مواد با استفاده از چرخ گوشت با قطر چشمه ۲ میلی متر، رشته‌های غذایی ایجاد شد. رشته‌های ایجاد شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده تا خشک گردند، در نهایت پلت‌های ایجاد شده تا زمان استفاده در یخچال(دمای ۳ درجه سانتی گراد) نگه‌داری شدند. در طول دوره آزمایش ماهی‌ها دو بار در روز در ساعت ۸:۰۰ و و ۱۸:۰۰ به میزان حداکثر ۳ درصد از وزن بدن با جیره‌های غذایی آزمایشی غذادهی شدند.

۲.۴. تعیین فعالیت آنزیم‌های گوارشی

به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک و نانوذرات آهن بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، در پایان دوره از هر مخزن ۵ قطعه ماهی (میانگین وزن ماهیان در تیمارهای مختلف در پایان دوره بین ۵۵ تا ۶۶ گرم متغیر بود) بطور تصادفی نمونه برداری و به وسیله جراحی دستگاه گوارش استحصال گردید. ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری غذادهی قطع گردید. سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آزمایشگاه سرم سازی رازی اهواز انجام گرفت. در این تحقیق فعالیت ۶ آنزیم آلفا-آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز، فسفاتاز قلیایی و پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. برای این‌کار نمونه‌ها پس از توزین، به نسبت ۱ به ۹ (w/v) با بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد در pH ۷/۸ همژن شدند (Rungruangsak *et al*., 2002؛ Cahu *et al*., 1999). سپس بوسیله سانتریفوژ یخچال‌دار، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت از مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد. کلیه سنجش‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت.

۲.۵. سنجش پروتئین محلول

پروتئین محلول نمونه‌ها به روش Bradford (۱۹۷۶) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد سنجیده شد. ۳۰ میکرولیتر از عصاره همژن آنزیمی، توسط بافر به حجم ۶۰۰ میکرولیتر رقیق‌سازی شد. بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های فوق به محلول برادفورد، جذب در ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. سپس قرائت نوری بدست آمده از نمونه‌ها به منحنی استاندار BSA منتقل و میزان پروتئین محلول محاسبه شد.

۲,۶. سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از سوبسترای نشاسته انجام پذیرفت (Bernfeld, 1951). ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره همژن آنزیمی به همین مقدار نشاسته ۱ درصد اضافه گردید و عمل انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. سپس معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (۱۵۰ میکرولیتر) به آن اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

۲.۷. سنجش فعالیت آنزیم تریپسین

فعالیت آنزیم تریپسین از روش Worthington (۱۹۹۱) با استفاده از N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE)، به عنوان سوبسترا، سنجیده شد. ۳۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی به مخلوط سوبسترا و اسید کلریدریک افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه قرائت نوری در طول موج ۲۵۳ nm نانو متر انجام شد (Worthington, 1991).

۲.۸. سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین

سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین بر اساس روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و با استفاده از سوبسترای بنزوئیل- L – تیروزین اتیل استر (BTEE) انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط سوبسترا و بافر تریس افزوده شد و جذب نوری به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۲۵۶ نانومتر سنجیده شد.

۲.۹. سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. بدین منظور از امولسیون روغن زیتون (به عنوان سوبسترا) و معرف تیمولفتالئین استفاده گردید.

۲.۱۰. سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت شرکت زیست شم (زیست شم، ایران) انجام گرفت. ۳۰ میکرو لیتر نمونه آنزیمی به مخلوط بافر بیکربنات و معرف پارانیتروفنیل فسفات افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. از سود به عنوان متوقف کننده واکنش استفاده شد و در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۲.۱۱. سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از سوبسترای کازئین، از روش Worthington (۱۹۹۱) انجام گردید. ۲۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی به مخلوط سوبسترا (کازئین) و کلرید کلسیم اضافه شد. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن ۱ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک و سپس ۱ میلی لیتر سود و ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین به نمونه‌ها افزوده شد و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید.

۲.۱۲. سنجش فلور باکتریایی روده

به منظور سنجش تعداد کل باکتری‌ها و همچنین تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس موجود در روده ماهی، نمونه گیری در پایان دوره آزمایش به صورت زیر انجام پذیرفت. تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری قطع گردید. ماهی‌ها بر روی یخ به روش قطع نخاع کشته شدند. دستگاه گوارش پس از ضدعفونی سطح بدن ماهی با اتانول ۷۰ درصد، جداسازی و سپس محتویات روده در شرایط کاملا استریل و بر روی یخ استخراج گردید. یک گرم از محتویات روده در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوزیک رقیق شد. از این نمونه رقت‌های سریالی تهیه گردید و با استفاده از کشت سطحی روی محیط کشت نوترینت آگار و MRS آگار به ترتیب برای سنجش تعداد کل باکتری‌ها و تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس روده بکار گرفته شدند (Mahious *et al*., 2006).

۲.۱۳. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش تجزیه واریانس یک طرفه و دو طرفه نرم‌افزار SPSS نسخه شماره ۲۰ استفاده شد. برای بررسی معنی‌داری بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

۳.۱. فعالیت آنزیم آمیلاز

بر اساس نتایج بدست آمده از آنالیز آماری، فعالیت آنزیم آمیلاز در ماهیان کپور تحت تاثیر مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن وپروبیوتیک لاکتوباسیلوس درجیره غذایی قرارگرفت. به نحوی که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۴ (۰/۵ میلی‌گرم نانو)، ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک)، ۶ (۰/۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) با تیمار شاهد (تیمار ۱) مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱).

۳.۲. فعالیت آنزیم تریپسین

مطابق نتایج این تحقیق مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن وپروبیوتیک لاکتوباسیلوس درجیره غذایی باعث

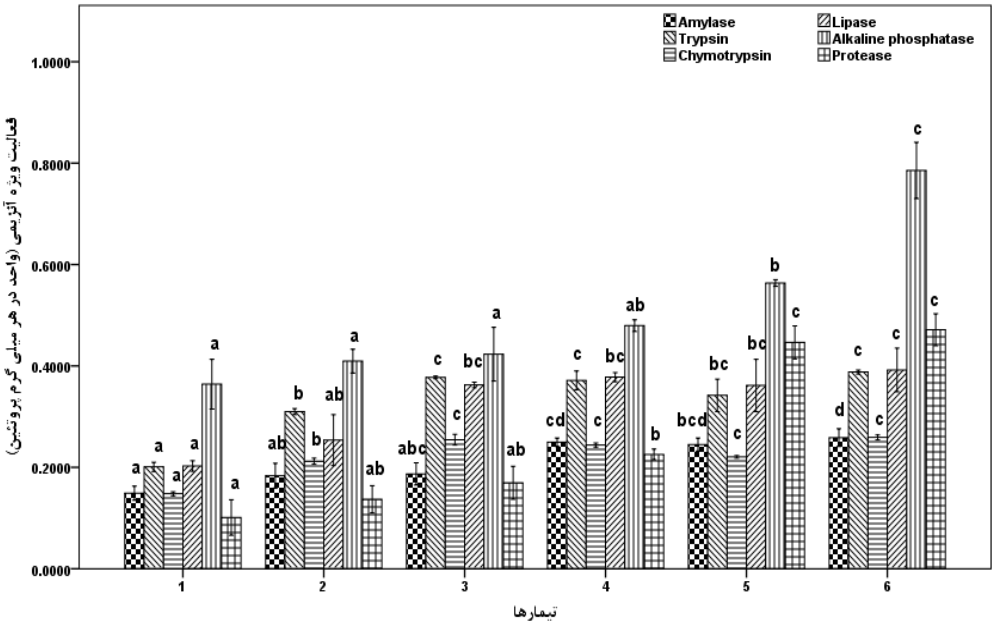
ایجاد تغیرات در میزان فعالیت آنزیم تریپسین در ماهیان کپورشده‌اند، به طوری که کلیه تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک و نانو ذرات آهن اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند(P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین مربوط به تیمار ۶ (غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ میلی‌گرم/گرم نانو ذرات آهن به همراه 10^8 CFU/g پروبیوتیک) وکمترین مقدار آن مربوط به تیمار شاهد بوده است (P<۰/۰۵) (شکل ۱).

۳.۳. فعالیت آنزیم کیموتریپسین

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در جیره غذایی ماهیان کپور باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین شده است. بر این اساس در تمامی تیمارهای حاوی مکمل‌های نانوذرات وپروبیوتیک، فعالیت این آنزیم به طور معنی‌داری از تیمار شاهد بیشتر بوده است (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در تیمار ۶ (غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ mg/g نانو ذرات آهن به همراه $۱۰^۸$CFU/g پروبیوتیک) و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۱).

۳.۴. فعالیت آنزیم لیپاز

با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری، فعالیت آنزیم لیپاز تحت تاثیر مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس، تقریبا یک روند افزایشی را در بین تیمارها نشان می‌دهد به طوری که به جز تیمار ۲ (حاوی $۱۰^۸$CFU/g پروبیوتیک)، بقیه تیمارها، افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵) (شکل ۱).



شکل ۱ - نمودار فعالیت ویژه آنزیمی در تیمارهای مختلف
(حروف لاتین مختلف در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.)

۳.۵. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت تاثیر مکمل‌های غذایی نانو ذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در تیمار ۶ (غذای تجاری حاوی ۰/۵۰ mg/g نانو ذرات آهن به همراه $۱۰^۸$CFU/g پروبیوتیک) بیشترین حد را نشان داد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشته است(P<۰/۰۵) البته سایر تیمارها به جز تیمارهای ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) و ۶ (۰/۵ میلی‌گرم

نانو+پروبیوتیک)، در عین افزایش نسبت به گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری با این گروه نداشتند (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

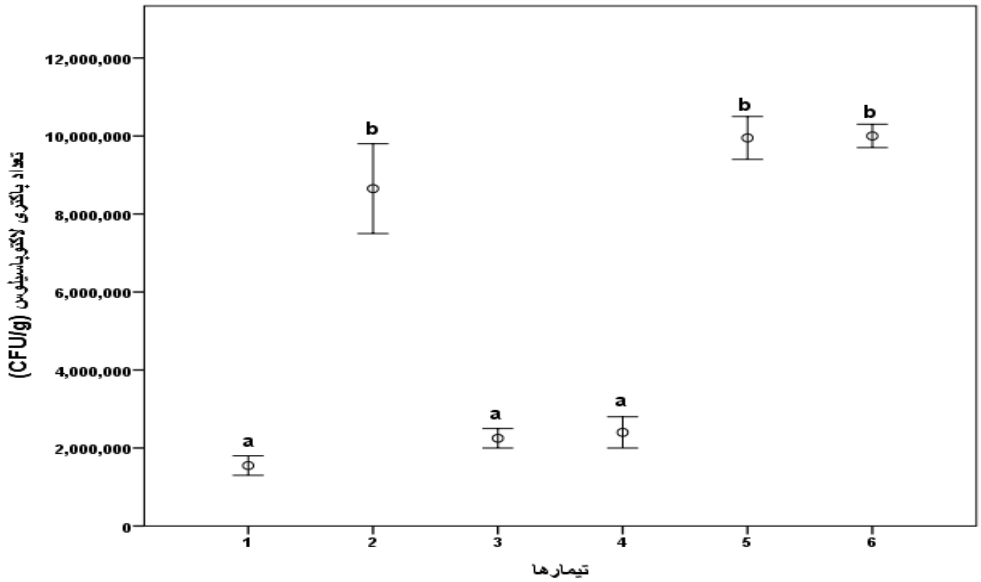
۳،۶. فعالیت آنزیم پروتئاز

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه آماری، فعالیت آنزیم پروتئاز در ماهیان کپور تحت تاثیر مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس درجیره غذایی قرارگرفت. به طوری که اختلاف معنی‌داری بین تیمار تیمارهای ۴ (۰/۵ میلی‌گرم نانو)، ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) و ۶ (۰/۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) با گروه شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). اما بین سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید(P>۰/۰۵) (شکل ۱).

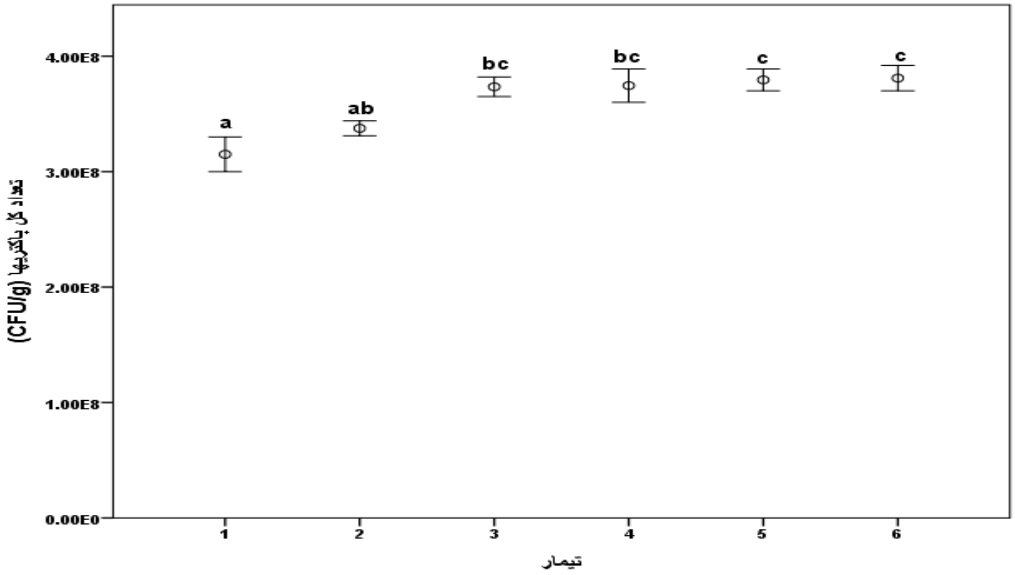
۳.۷. سنجش باکتریایی دستگاه گوارش

نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد باکتری لاکتو باسیلوس در روده ماهیان کپور تحت تاثیر مکمل‌های غذایی نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس درجیره غذایی قرارگرفت. به طوری که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۲ (پروبیوتیک به تنهایی)، ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) و ۶ (۰/۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) با گروه شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). هر چند تعدا لاکتو باسیلوسها در روده ماهیان تیمارهای ۳ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو) و ۴ (۰/۵ میلی‌گرم نانو) که تنها نانو ذرات آهن را دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شاهد کمی افزایش یافت، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ۲).

سنجش تعداد کل باکتری‌ها نشان داد که این تعداد در تیمارهای ۳ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو)، ۴ (۰/۵ میلی‌گرم نانو)، ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) و ۶ (۰/۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بوده است (P<۰/۰۵). اما تیمار ۲ که با مکمل پروبیوتیک تغذیه شده بود، علارغم افزایشی اندک با تیمار شاهد از نظر تعداد کل باکتری‌ها تفاوتی را نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۲ - نمودار تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس دستگاه گوارش ماهی کپور در تیمارهای مختلف (حروف لاتین مختلف در هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشد.)



شکل ۳- نمودار تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش ماهی کپور در تیمارهای مختلف (حروف لاتین مختلف در هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد است).

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

توانایی ماهی به منظور استفاده از مواد غذای و رسیدن به رشد بهینه، وابسته به ظرفیت بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ماهی برای هضم و انتقال مواد مغذی است، که آنزیم‌ها مهمترین نقش را در شکسته شدن و هضم و جذب غذا در دستگاه گوارش بر عهده دارند. آگاهی از سطح فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی ماهیان موثر باشد، همچنین رشد و بقای ماهی دارای ارتباط تنگاتنگ با رشد روده، هضم و ظرفیت جذب غذا می‌باشد (Hidalgo *et al*., 1999). از این‌رو مطالعه عوامل و نهاده‌های تاثیر گذار بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در همه تیمارها در اثر استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و نانو آهن آنزیم‌های گوارشی افزایش یافت. البته این افزایش در تیمارهایی که پروبیوتیک به همراه نانوذرات آهن مورد استفاده قرار گرفت، شامل تیمارهای ۵ (۰/۲۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک) و ۶ (۰/۵ میلی‌گرم نانو+پروبیوتیک)، مشهودتر بود. مطالعات متعددی تاثیر افزایشی باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بر آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور را نشان داده‌اند (Renuka *et al*., 2013; Valiallahi *et al*., 2018; Mohammadian *et al*., 2022). Mohammadian و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که افزودن دو باکتری پروبیوتیکی *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* به جیره غذایی ماهی کپور باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های گوارشی در این ماهی گردید. البته در سایر آبزیان نیز تحقیقات مشابهی صورت پذیرفته است. Jafarian (۲۰۰۶)، غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) با پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی را مورد بررسی قرار دادند و عنوان نمودند که باعث افزایش آنزیم‌های گوارشی، بقاء و بهبود عملکرد تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) می‌گردد. در تحقیقات مشابه دیگری، باسیلوس‌های پروبیوتیکی توانستند از طریق فعالیت‌های متابولیکی خود در دستگاه گوارش لاروهای فیل ماهی موجب بهبود کارآیی تغذیه و بازده آنزیم‌های گوارشی گردند (Jafarian, 2006). از سوی دیگر Mohammadian (۲۰۱۳)، در مطالعه‌ای بر روی آنزیم‌های گوارشی ماهی شیربت با استفاده از

خوراک حاوی سه پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازئی) نشان دادند که تیمار لاکتوباسیلوس پلانتاروم (به میزان کمتر) و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (به میزان بیشتر) بر فعالیت آنزیمی تاثیر افزایشی می‌گذارد. Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۶) نیز استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی تجاری از خانواده باسیلوس‌ها را در پرورش میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) بررسی نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که این پرو بیوتیک‌ها باعث افزایش در ترشح آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز کل و همچنین افزایش درصد بقاء و وزن میگوهای پرورشی گردید. حال اینکه دقیقا در طی چه فرآیندهایی باکتری‌های پروبیوتیکی قادر به افزایش آنزیم‌های گوارشی آبزیان می‌شوند، به نظر ناشناخه می‌آید و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. اما آنچه مسلم است اینکه بخشی از این افزایش آنزیمی ممکن است به خاطر ترشح آنزیم‌های خارج سلولی توسط خود باکتری‌ها باشد. این مسئله که باکتری‌های پروبیوتیکی قادر به تولید آنزیم‌های خارج سلولی هستند در تحقیقی توسط Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۹) تائید شده است. آنها نشان دادند که طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها از جمله باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم مورد استفاده در این تحقیق قادر به ترشح آنزیم‌های خارج سلولی از نوع آمیلاز، لیپاز و پروتئاز هستند.

در خصوص تاثیر نانوذرات آهن بر آنزیم‌های گوارشی آبزیان تا کنون مطالعاتی صورت نپذیرفته است. Mohammadi و Tokmechi (۲۰۱۵) تأثیر همزمان نانو ذرات آهن به صورت افزودنی و پروبیوتیک *Lactobacilus casei* را در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۲ گرمی مورد مطالعه قرار داده اند، این تحقیق نشان دهنده‌ی این مهم بوده است که در نتیجه تأثیر توأم این مواد، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، وزن اکتسابی افزایش یافت و همچنین باعث افزایش فلور این باکتری در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است.

در مطالعه دیگری Ling و همکاران (۲۰۱۰) سطوح مختلف آهن اضافه شده به جیره و تأثیر آن بر رشد و محتوای بدن و فعالیت آنزیم‌های روده در بچه ماهیان کپور معمولی را سنجیدند، نتایج نشان داد که این افزایش آهن علاوه بر اینکه سبب افزایش محتوای آهن بدن می‌شود، بلکه فعالیت تریپسین، لیپاز، آلفا آمیلاز، Na+/K+ ATPase، آلکالین فسفاتاز و گاما گلوتامیل ترنسپپتیداز نیز با افزایش آهن در سطوح جیره افزایش پیدا کرده است. این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش آهن، افزایش فعالیت آنزیم‌های هضم کننده در بچه ماهیان کپور معمولی را باعث شده است.

شاید بتوان تاثیر مثبت املاح آهن بر آنزیم‌های گوارشی، که در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد، را در رابطه با وضعیت رشد و تکامل دستگاه گوارش توجیه نمود. آنچنانکه Ling و همکاران (۲۰۱۰) بیان نمودند ارتفاع چین‌های روده‌ای با افزایش آهن جیره غذایی، افزایش یافت. این افزایش در ارتفاع چین‌های دستگاه گوارش طبیعتا با افزایش سلول‌های ترشح کننده آنزیم ممکن است سبب افزایش فعالیت آنزیمی در دستگاه گوارش گردد.

لازم به ذکر است که خود آهن به عنوان یکی از عوامل محدود کننده رشد جوامع میکروبی می‌باشد، که با افزودن آن می‌توان رشد کلونی‌های پروبیوتیکی را افزایش داد (Ziaei-nejad, 2016). از این رو آهن ممکن است در دستگاه گوارش با تقویت رشد باکتری‌های پروبیوتیکی، بطور غیر مستقیم سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارش گردد.

تحلیل نتایج سنجش تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس و تعداد کل باکتری‌ها در روده ماهی کپور تحت تاثیر تیمارهای مختلف نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس یافته‌های جالب توجهی را نشان داد. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس در تیمارهای ۲، ۵ و ۶ که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس به تنهایی و یا با نانو ذرات آهن به جیره غذایی ماهی افزوده شده بود، بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار کنترل (تیمار ۱) و نیز تیمارهای نانو ذارت آهن

بدون پروبیوتیک (تیمارهای ۳ و ۴) بود. این در حالی است که تعداد کل باکتری‌های در تیمار ۲ که تنها از پروبیوتیک استفاده کرده بود هر چند نسبت به تیمار شاهد کمی افزایش داشته است، اما این افزایش معنی‌دار نبوده است. مقایسه این دو پارامتر در تیمار ۲ و تیمار شاهد می‌تواند نشان دهنده پیروزی باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلی در رقابت با سایر باکتری‌ها و کلونی سازی دستگاه گوارش ماهی باشد. همانگونه که Ringo و Gatesoupe (۱۹۹۸) بیان نموده اند، باکتری‌های لاکتوباسیلوس از طریق تولید باکتریوسین‌ها می‌توانند از رشد باکتری‌های بیماریزا در ماهی جلوگیری کنند.

تعداد لاکتوباسیل‌ها در تیمارهای ۵ و ۶ که در کنار پروبیوتیک از نانو ذرات آهن نیز استفاده نمودند، کمی بیشتر از تیمار ۲ (دریافت کننده پروبیوتیک به تنهایی) بود. این افزایش جزیی ممکن است به دلیل تاثیر آهن در رشد باکتری‌ها باشد به گونه‌ای که Duhutrel و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که باکتری‌های اسید لاکتیکی غیر بیماریزا برای رشد به آهن نیاز دارند.

اما چرا در تیمارهای استفاده کننده از نانو ذرات آهن (تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶) تعداد کل باکتری‌ها بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار کنترل بوده است؟ تنها دلیل و توجیهی که این نتایج را می‌تواند تحلیل کند، در کنار اینکه افزودن نانوذرات آهن، به عنوان عامل محدود کننده رشد باکتریایی، ممکن است باعث افزایش رشد باکتری‌های مختلف در این تیمارها شده باشد، احتمالا یافته‌های Ling و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد که بیان نمودند ارتفاع چین‌های روده‌ای با افزایش آهن جیره غذایی، افزایش خواهد یافت. طبیعتا با افزایش احتمالی ارتفاع چین‌های روده‌ای، می‌توان انتظار داشت که فضای بیشتری برای استقرار باکتری‌ها در دستگاه گوارش فراهم خواهد شد و در نتیجه تعداد کل باکتری‌ها افزایش پیدا خواهد نمود.

نتیجه‌گیری نهایی

آنچه می‌توان بطور کل نتیجه گرفت این است که هم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و هم نانو ذرات آهن می‌توانند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور گردند. همچنین این باکتری‌ها توانایی خوبی در استقرار در دستگاه گوارش ماهی دارند. این افزایش آنزیمی طبیعتاً خواهد توانست رشد ماهی و فاکتورهای تغذیه‌ای را بهبود دهد.

۵. منابع

References

Akbary, P., Jahanbakhshi, A., 2019. Nano and macro iron oxide (Fe2O3) as feed additives: effects on growth, biochemical, activity of hepatic enzymes, liver histopathology and appetite-related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus*), *Aquaculture* 510, 191–197.

Bernfeld, P., 1951. Amylase α and β. Methods in Enzymology 1, 149-158.

Bradford, M.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.

Cahu, C.L., ZamboninoInfante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchuslabrax larvae. *Aquaculture* 171, 109–11.

Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 1, 1-29.

Duhutrel, P., Bordat, C., Wu, T. D., Zagorec, M., Guerquin-Kern, J. L., Champomier-Vergès, M. C., 2010. Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium Lactobacillus sakei as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology 76*(2), 560–565.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics* 95, 271-278.

Ghobadi, S., Rajabi, H., Hosseinifard, M., Palangi, L., 2017. Survey on effects of different levels of nano iron on growth and nutrition performance in rainbow trout. *Breeding and Aquaculture Sciences Journal* 1(1), 67-82.

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

Jafarian, H., 2006. The effect of *Bacillus* bacteria as a probiotic on the survival growth and activity of digestive enzymes in Acipenser persicus during larval rearing by enrichment with *Artemia urmiana*, PhD thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Kazuń, B., Małaczewska, J., Kazuń, K., Żylińska-Urban, J., Siwicki, A. K., 2018. Immune-enhancing Activity of Potential Probiotic Strains of *Lactobacillus Plantarum* in the Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fingerling. *Journal of veterinary research 62*(4), 485–492.

Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima*. *Aquaculture International* 14, 219–229.

Mashjoor, S., Yousefzadi, M., Zolgharnain, H., Kamrani, E., Alishahi, M., 2018. Induced effects of acute exposure of chemogenic and biosynthetic iron oxide (Fe3O4) nanoparticles on alteration of haematological, biochemical and immune indices in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatics Physiology and Biotechnology* 6(3), 77-110.

Mohammadi, N., Tukmechi, A., 2015. The effects of iron nanoparticles in combination with Lactobacillus casei on growth parameters and probiotic counts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Journal of Veterinary Research* 70(1), 47-53.

Mohammadian, T., 2013. Evaluation of probiotic potency and immune stimulation of some *Lactobacillus* isolated from the intestine of *Barbus grypus*. Ph.D. Thesis. Shahid Chamran University of Ahwaz.

Mohammadian, T., Monjezi, N., Peyghan, R., Mohammadian, B., 2022. Effects of dietary probiotic supplements on growth, digestive enzymes activity, intestinal histomorphology and innate immunity of common carp (*Cyprinus carpio*): a field study. *Aquaculture* 549, 737-787.

Renuka, K. P., Venkateshwarlu, M., Ramachandra Naik A. T. and Prashantha Kumara, S. M., 2013. Influence of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Current Research* 5(07), 1696-1700.

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

Ling, J. L., Feng, J., Liu, J., Jiang, W-D., Jiang, k., Hu, S-H., Li, X-C., Hou, Z., 2010. Effect of dietary iron levels on growth, body composition intestinal enzyme activities of juvenile jian carp. *Aquaculture Nutrition* 16, 616-624.

Neilads, J.B., 1981. Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50,715-731.

Ramos, M.A., Batista, S., Pires, M.A., Silva, A.P., Pereira, L.F., Saavedra, M.J., Ozório, R.O.A., Rema, P., 2017. Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal* 11(8), 1259-1269.

Reid, R. T., Live, D. H., Faulkner, D. J., Butler, A., 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature* 366:455-458.

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

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygård, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U., 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 644- 654.

Suzer, C., Çoban, D., OkanKamaci, H., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., and Küçüksari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparusaurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140-145.

Tavana, M., Kalbassi, M.R., Abedian Kenari, A., Johari, S.A., 2014. Assessment of assimilation and elimination of silver and TiO2 nanoparticles in *Artemia franciscana* in different salinities, *Journal of Oceanology* 5, 91–103.

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., Rungruangsak-Torrissen K., 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture* 322, 1-9.

UN (United Nation). 2009. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations, New York and Geneva. 568P.

Valiallahi, J., Pourabasali, M., Janalizadeh, E. and Bucio, A., 2018. Use of *Lactobacillus* for Improved Growth and Enhanced Biochemical, Hematological, and Digestive Enzyme Activity in Common Carp at Mazandaran, Iran. *North American Journal of Aquaculture* 80, 206-215.

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.

Worthington, C.C., 1991. Worthington manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold, New Jersey, pp, 80-85.

Zhang, H., Wang, H., Hu, K., Jiao, L., Zhao, M., Yang, X., and Xia, L., 2019. Effect of dietary supplementation of *Lactobacillus casei* YYL3 and *L. plantarum* YYL5 on growth, immune response and intestinal microbiota in channel catfish, *Animals (Basel)* 9, 1005–1020.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M., 2006. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*). *Aquaculture* 252, 516-524.

Ziaei-nejad, S., Rafiei, G., Ghafleh Marammazi, J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., 2009. Assay of enzyme production in isolated bacteria from seabream, *Acanthopagrus latus*, in in vitro condition with the purpose of probiotic screening. *Journal of marine sciences and technology* 8(1-2), 1-9.

Ziaei-Nejad S., Salehi L. M., Ghaedina B., Johari S. A., Aberomand A., 2015. In vitro antagonistic properties of copper nanoparticles and probiotic *Bacillus subtilis* against pathogenic luminescent *Vibrio harveyi*. *AACL Bioflux* 8(3), 445-452.

Ziaei-nejad, S., 2016. Application of probiotics in modern aquaculture. Iranian fisheries science research institute. 172 p.

Ziaei-nejad, S., Abaei, N.K., Doost, B.N., Johari, S.A., 2021. Effects of Supplemental Feeding of Common Carp (*Cyprinus carpio*) with Iron Nanoparticles and Probiotic *Lactobacillus* on Blood Biochemical Factors. *Biology Bulletin* 48, 177–184.