

## "مقاله پژوهشی"

## تأثیر مصرف خوراکی کیتوزان بر روی رشد و فلور باکتریایی رودی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد حسین سیف<sup>۱</sup>، علی پارساخانقاه<sup>\*</sup>

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد سنج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۸

### چکیده

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از گونه‌های مهم پرورشی دنیا است. استفاده از مواد محرک رشد، محرک ایمنی و پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند راندمان پرورش این ماهی را بهبود بخشد. این بررسی برای تعیین اثرات پری‌بیوتیکی کیتوزان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌ریش‌کمان انجام شد. بدین منظور کیتوزان با مقادیر ۱ درصد، ۰/۵ درصد و ۰/۲۵ درصد به غذای مصرفی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۱۸۰ گرم اضافه شد. بعد از ۱۵۰ روز ماهیان از نظر شاخص‌های عملکردی رشد و جمعیت کلی باکتری‌ها و لاکتوباسیل‌ها روده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌دار در گروه تیمار ۰/۲۵ درصد با گروه کنترل در شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه بود ( $p < 0.05$ ). همچنین تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه تیمار ۰/۲۵ درصد و تیمار ۰/۵ درصد با گروه کنترل در تعداد کل باکتری‌ها و لاکتوباسیل‌ها وجود داشت ( $p < 0.05$ ). بر این اساس می‌توان کیتوزان در دوز ۰/۲۵ درصد را به عنوان پری‌بیوتیکی مناسب با تأثیرات چشمگیر در پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در نظر گرفت و استفاده از آن را در جیره غذایی این ماهی توصیه کرد.

**کلمات کلیدی:** قزل‌آلای رنگین‌کمان، کیتوزان، رشد، فلور باکتریایی روده، عملکرد.

## مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از گونه‌های مهم پرورشی در دنیا بوده که هرگونه فعالیت علمی در جهت کاهش مشکلات موجود در روند پرورش این گونه تجاری از اهمیت بالایی برخوردار است چرا که نتیجه آن به طور مستقیم در افزایش تولید و رونق بیشتر آبی‌پروری متجلی خواهد شد. برای دستیابی به این هدف در جیره غذایی ماهیان می‌توان موادی را افزود که با استفاده از آنها، میزان رشد ماهیان بیشتر شده و طی زمان کمتری به محصول نهایی با همان کیفیت و چه بسا بالاتر برسد. این مواد تحت عنوان محرک‌های رشد شناخته شده‌اند که نمی‌توانند جایگزین غذا و مواد مغذی موثر در جیره غذایی ماهیان باشند؛ ولی می‌توانند در افزایش جذب و ترکیب عناصر غذایی و افزایش میزان رشد، بسیار موثر واقع شوند. امروزه به کارگیری مواد محرک رشد در جیره غذایی آبزیان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. دلیل اساسی و منطقی استفاده از این محرک‌ها، افزایش رشد، کاهش مصرف غذا، افزایش تولید و به دست آوردن محصولی با کیفیت بالا می‌باشد (Staykov *et al.*, 2007).

ماهیان در محیط اسارت از شرایط طبیعی بیولوژیکی و فیزیوشیمیایی مطلوب زندگی بهره‌مند نبوده و محکوم به ادامه زندگی در شرایط موجود می‌باشند که ممکن است نامساعد بوده و باعث کاهش مقاومت بدن آنها در برابر بیماری‌های گوناگون شود (مخیر، ۱۳۸۵). ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان به ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان در این راستا می‌باشد. علاوه بر این، بروز و

شیوع بیماری‌ها در کنار پیشرفت و توسعه صنعت آبی‌پروری، از لحاظ اقتصادی این صنعت را تحت تاثیر قرار داده، به نحوی که امروزه کنترل برخی از بیماری‌ها به امری دشوار تبدیل شده است (Bricknell and Dalmo, 2005).

پری‌بیوتیک‌ها از اجزای غذایی غیرقابل هضمی هستند که تاثیرات مفید خود را در میزبان به صورت تحریک رشد و یا افزایش تعداد و فعالیت یک یا چند گونه از باکتری‌های دستگاه گوارش نشان می‌دهند (Gibson and Roberfroid, 1995). در مورد پری-بیوتیک‌ها مزایای بسیاری ذکر شده؛ اما مزیت اصلی آنها در قیاس با پروبیوتیک‌ها این است که از اجزای خوراکی طبیعی می‌باشند و برخلاف پروبیوتیک‌ها ارگانسیم نبوده و تاثیرات مخرب زیست محیطی هم ندارند (Amiri and Yousefian, 2009).

در بین پری‌بیوتیک‌های مورد استفاده در تغذیه انسان و سایر جانوران، کربوهیدرات‌ها بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در میان کربوهیدرات‌ها اینولین، الیگوفرکتوز، ترانس گالاکتوالیگوساکارید و لاکتوز را می‌توان به عنوان پری‌بیوتیک‌های کاربردی‌تر نام برد. در حال حاضر پری‌بیوتیک‌ها بیشتر بر اساس توانایی‌شان در افزایش رشد میکروارگانسیم‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک انتخاب می‌شوند. جیره‌های غذایی حاوی پری‌بیوتیک، نه تنها مواد مغذی ضروری برای جانور تغذیه‌کننده را تامین می‌نمایند؛ بلکه می‌توانند به عنوان یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آنها در برابر استرس و عوامل بیماری‌زا قلمداد شوند (Panesar *et al.*, 2013). کیتوزان یک پلی ساکارید خطی بوده که از اتصال منومرهای استیل‌زدایی شده (D-glucosamine)

و اندکی به حضور طبیعی این باکتری ها در دستگاه گوارش و به ویژه روده ماهیان اشاره شده و مطالعات معدودی روی گونه‌های لاکتوباسیلوس دستگاه گوارش آزاد ماهیان صورت پذیرفته است، اما ضرورت انجام مطالعات گسترده بر روی باکتری‌های دستگاه گوارش گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی احساس می‌گردد (Amiri and Yousefian, 2009). هدف از این مطالعه بررسی اثر کیتوزان بر ضریب رشد ویژه و جمعیت باکتری‌های روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بود.

### مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۸۸ قطعه ماهی قزل‌آلای  $180 \pm 5$  گرمی به ظاهر سالم انتخاب شده و به صورت تصادفی به ۳ گروه تیمار و یک گروه کنترل در استخر پرورش ماهی واقع در شهرستان نهاوند استان همدان با ابعاد ۲ در ۰/۵ متر و آبگیری مجزا به ارتفاع ۶۰ سانتی متر تقسیم بندی شدند. آب مورد استفاده از چشمه تامین می‌شد و در تمام مدت مداخله بشکل جاری بود و میانگین دما، شوری، pH و اکسیژن محلول به ترتیب ۱۴ درجه سانتی‌گراد، ۰/۲۵ گرم در لیتر، ۷ و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. ماده کیتوزان مورد نیاز این تحقیق از شرکت Sigma-Aldrich با وزن مولکولی Medium محصول کشور آلمان تهیه شد. برای تغذیه ماهیان از غذای کنسانتره 2 GFT ساخت شرکت فرادانه استفاده شد. در ادامه با توجه به میانگین وزنی ماهیان و دمای آب میزان غذادهی روزانه هر تیمار از روی جدول استاندارد غذادهی محاسبه گردید (Hardy, 2002). سپس کیتوزان به میزان یک درصد در تیمار ۱، نیم درصد در تیمار ۲ و بیست و پنج صدم درصد در تیمار ۳ با ترازوی دیجیتالی وزن شده و به‌طور تدریجی با هم

ایجاد می‌شود. کیتوزان تجاری از پوسته یا اسکلت خارجی سخت‌پوسانی مثل میگو و خرچنگ‌ها استخراج می‌شود، به طوری که این ماده را از استیل‌زدایی کتین موجود در ساختار اسکلت خارجی این موجودات تهیه می‌نمایند. کیتوزان دارای بار الکتریکی مثبت بوده و با توجه به درصد استیل‌زدایی آن و میزان pH در حلال‌های اسید و خنثی قابل حل می‌باشد. این خاصیت باعث می‌شود تا کیتوزان به عنوان یک جاذب یا چسبانه طبیعی عمل کرده و به سرعت به سطوح دارای بار منفی مثل غشاهای موکوسی متصل شود و باعث افزایش انتقال داروهای قطبی از طریق سطوح اپیتلیال شده و به عنوان یک ماده طبیعی سازگار با بدن عمل می‌کند (Kim et al., 2005). کیتوزان یکی از فراورده‌های جانبی برخی از آبزیان بوده و تاثیرات آن در افزایش ایمنی ماهیان ثابت گردیده است (طافی، ۱۳۸۹).

در مطالعه‌ای تأثیر کیتوزان و باسیلوس کوآگولانس بر روی میزان رشد، زنده‌مانی و سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی کویی مورد بررسی قرر گرفت و نتایج حاصله نشان داد که استفاده از این دو باعث اثر سینرژیستی شده و میزان رشد و زنده‌مانی و پاسخ‌های سیستم ایمنی را نسبت به گروه شاهد افزایش داد (Lin et al., 2012).

در بررسی دیگری نشان داده شد که میزان افزایش لیزوزیم پلاسما، کبد و کلیه در ماهی کپور معمولی که با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به صورت محلول در آب به مدت ۹۶ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند بیشتر از ماهیان گروه کنترل بود (Dautremepuits et al., 2003). علی‌رغم وجود مطالعات ارزشمند در زمینه نقش و اهمیت این باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش در موجودات خونگرم، تنها در مطالعات معدود

زدن بروی غذا پاشیده شد تا تمامی سطوح پلت‌ها آغشته شود (اسمعیلی و همکاران، ۱۳۹۱). گروه ۴ در این تحقیق به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در تمام طول دوره با جیره‌ی غذایی بدون کیتوزان تغذیه شد. این روند تا ۲۱ هفته ادامه یافت و در پایان دوره تمامی ماهیان صید شده و بعد از توزین و محاسبه ضریب رشد ویژه به آزمایشگاه ارسال شدند (Huang *et al.*, 2008).

۱۰۰\*((زمان اولیه-زمان ثانویه)/وزن اولیه-وزن ثانویه))=ضریب رشد ویژه  
(افزایش وزن/غذای خورده شده)=ضریب تبدیل غذایی

کالبدگشایی ماهی‌ها طبق اصول استاندارد انجام گردید (شاهسونی، ۱۳۸۱) و بعد از اخذ مدفوع در بشر استریل و توزین آن نه برابر آن سرم فیزیولوژی اضافه شد و رقت‌سازی در لوله‌های آزمایش از قبل استریل شده حاوی ۹ سی سی سرم فیزیولوژی تا رقت ۷-۱۰ انجام شد. محیط‌های کشت Plate count agar و MRS agar محصول شرکت Merk آلمان برای شمارش کل باکتری‌های و لاکتوباسیل‌ها مورد استفاده قرار گرفت. رقت‌های سریالی از نمونه مدفوع به منظور رصد جمعیت کل باکتری‌های روده بمیزان ۱ سی سی از هر رقت به پلت‌های استریل ۸ سانتی متری منتقل شد و در ادامه با اندازه‌گیری دمای محیط کشت Plate count agar در محدوده استاندارد ۴۲ تا ۴۸ درجه سانتی‌گراد به روش پورپلنت کشت داده شد. همچنین برای رشد لاکتوباسیل‌ها از محیط کشت MRS agar مانند روش قبلی استفاده شد با این تفاوت که در اینجا از روش

کشت پورپلنت دو لایه به منظور اعمال بهتر شرایط بی-هوازی استفاده شد و بعد از کشت اول و سرد شدن محیط کشت یک لایه دیگر محیط کشت به سطح پلت اضافه شد. برای شمارش کل باکتری‌ها پلیتها بعد از سرد شدن در دمای اتاق به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. محیط کشت-های MRS agar نیز بعد از سرد شدن در دمای اتاق در داخل دسیکانور استریل با گازپک نوع A در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد و بعد از این مدت کلیه پلیتها با دستگاه کلنی کانتر مورد شمارش قرار گرفتند (Giannenas *et al.*, 2012). داده‌های به دست آمده در نرم افزار آماری SAS پس از بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون one way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### نتایج

نتایج ثبت شده در تمامی تیمارها نسبت به گروه کنترل در شاخص‌های عملکردی و میکروبی تفاوت‌های آشکاری را نشان داد ولی علی‌رغم تفاوت تمامی پارامترهای عملکردی در هر سه گروه تیمار با گروه کنترل تنها گروه تیمار ۳ دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد ( $p < 0.05$ ). در تیمار ۳ هر دو پارامتر عملکردی نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل داشت ولی در بقیه تیمارها با وجود کاهش در ضریب تبدیل غذایی و افزایش ضریب رشد ویژه نسبت به گروه کنترل ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۱).

بخش را در بسیاری از کشورها تحت تاثیر قرار داده است. همچنین استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سالیان اخیر جدای از تاثیرات مخرب زیست محیطی باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا گردیده که نیاز به چاره‌اندیشی در این زمینه و مصرف کنترل شده و دقیق آنتی‌بیوتیک‌ها در زمان بروز بیماری بیش از پیش احساس می‌شود و بهره‌گیری از روش‌های مختلف واکسیناسیون و استفاده از مواد محرک ایمنی، استفاده از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آبزیان می‌تواند رویکرد عملی و قابل قبولی باشد (Manyi-Loh *et al.*, 2018).

هضم و جذب در دستگاه گوارش ماهیان تحت تاثیر فاکتورهای متعددی نظیر فلور باکتریایی محیط روده می‌باشد و جمعیت و فراوانی این باکتری‌ها تحت تاثیر نژاد، محیط زندگی و تغذیه بوده و استفاده از موادی که بتوانند جمعیت باکتری‌های مفید روده را افزایش دهند منجر به افزایش هضم و جذب غذا، کاهش ضریب تبدیل غذایی و تاثیر غیر مستقیم روی سیستم ایمنی خواهند شد (مشکینی، ۱۳۹۱).

بررسی‌ها نشان داده که گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس، نقش قابل توجهی در مراحل هضمی دستگاه گوارش گونه‌های مختلف حیوانات اهلی دارند. لاکتوباسیل‌ها ارگانسیم هوازی اسید دوست و تخمیری هستند که اسید لاکتیک تولید کرده تا تعادل اسید را در روده تثبیت کنند. ماهیان به طور مداوم در معرض دامنه وسیعی از حضور میکروارگانسیم‌ها در محیط زیست می‌باشد. چندین تحقیق در ارتباط با باکتری‌های اسید لاکتیک در ماهی نشان می‌دهد که گونه‌ها مختلفی از لاکتوباسیل‌ها در روده ماهیان عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (کلپاسی و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۱: تغییرات ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در

تیمارها و کنترل		
تیمار	نرخ رشد ویژه	ضریب تبدیل غذا
۱	۱/۳۳±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۰/۹۱±۰/۰۵ <sup>a*</sup>
۲	۱/۲۳±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۰۳±۰/۰۳ <sup>a</sup>
۳	۱/۴۸±۰/۰۶ <sup>b</sup>	۰/۸۷±۰/۰۲ <sup>b</sup>
کنترل	۱/۱۲±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۱/۲۰±۰/۰۵ <sup>a</sup>

\*حروف غیر همسان نشان دهنده وجود رابطه معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ( $p < 0.05$ )

نتایج حاصله نشان داد که تعداد کلنی‌ها در گروه‌های تیمار ۲ (تغذیه شده با ۰/۵ درصد کیتوزان) و تیمار ۳ (تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان) تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) هم از جهت تعداد کلی باکتری‌ها و هم از نظر لاکتوباسیل‌ها با گروه کنترل و گروه تیمار ۱ دارد (جدول ۲). البته جمعیت کل باکتری‌ها و لاکتوباسیل‌ها در گروه تیمار ۳ نسبت به گروه تیمار ۲ بسیار بیشتر بود که نشان دهنده‌ی اهمیت دز کیتوزان در ایجاد نتایج می‌باشد.

جدول ۲: میانگین فلور باکتریایی روده در تیمارهای مختلف

تیمار	لاکتوباسیل‌های روده		کل باکتری‌های روده
	(CFU/ml)	(CFU/ml)	
۱	۹۸۵±۵/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۷۴×۱۰ <sup>۶</sup> ±۰/۰۷ <sup>a*</sup>	
۲	۸۳۰۰±۸/۰۲ <sup>b</sup>	۳/۴×۱۰ <sup>۶</sup> ±۰/۰۳ <sup>b</sup>	
۳	۱۷۲۰۰±۱۱/۰۵ <sup>c</sup>	۲۴×۱۰ <sup>۶</sup> ±۲/۰۱ <sup>c</sup>	
کنترل	۱۰۷۵±۹/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۸۶۵×۱۰ <sup>۶</sup> ±۰/۴۱ <sup>a</sup>	

\*حروف غیر همسان نشان دهنده وجود رابطه معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ( $p < 0.05$ )

## بحث

امروزه شیوع بیماری‌های مختلف به عنوان یک عامل محدود کننده در تولیدات آبی‌پروری و تجارت آن شناخته شده است، به طوری که توسعه اقتصادی این

که در تیمار تغذیه‌شده با اینولین هیچ سویه باسیلوسی مشاهده نشد و در گروه تغذیه شده با الیگوفروکتوز، حدود ۱۴ درصد کل جمعیت باکتریایی جدا شده از روده به باسیلوس‌ها تعلق داشت (Ainsworth *et al.*, 1994). بررسی دیگری نشان داد که ماهی کپور معمولی که با مخلوط ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر مس و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به صورت محلول در آب به مدت ۹۶ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند بیشتر از ماهیانی که تنها با ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان به صورت محلول در آب مورد تیمار قرار گرفته بودند میزان افزایش لیزوزیم پلاسما، کبد و کلیه نشان دادند و این علاوه بر اثرات درونی می‌تواند تاثیر مصرف کیتوزان به صورت سوسپانسیون در آب را نشان دهد (Dautremepuits *et al.*, 2004). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کیتوزان در صورت مصرف خوراکی باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریال در خون ماهی شده و از ابتلا به عفونت‌های باکتریایی جلوگیری می‌کند (Jana and Jana, 2020). محققین در مطالعه‌ای گزارش کردند که کیتوزان باعث افزایش تولید آنیون سوپراکسیداز در ماهی آزاد افیانوس اطلس می‌شود (Hoffman *et al.*, 1997).

در مطالعه‌ی دیگری اثر تجویز خوراکی کیتوزان بر مقاومت ماهی کپور معمولی در برابر عفونت با باکتری آئروموناس هیدروفیلا بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که گروه‌های تغذیه شده با ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در ماده غذایی تفاوت معناداری در افزایش مقاومت ماهیان نسبت به گروه شاهد را دارا بود (اسمعیلی و همکاران، ۱۳۹۱). در یک مطالعه‌ای تاثیر کیتوزان بروی پاسخ سیستم ایمنی غیراختصاصی و میزان رشد کپور معمولی در معرض آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا

همچنین گزارش شده است که بعضی از لاکتوباسیل‌ها که از دستگاه گوارش ماهی جدا شده‌اند، می‌توانند به عنوان پروبیوتیک عمل کنند و این‌ها قادر به جایگزینی در روده می‌باشند. از طرفی باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به میکروب‌های روده ماهی غالب نیستند و جهت حفظ و نگهداری باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط روده لازم است از بیرون و توسط غذا اضافه شده و یا جمعیت آنها تقویت شود. کاربرد چنین برنامه‌های غذایی باید در جهت سلامت ماهی و افزایش کیفیت آبی‌پروری بیشتر مورد ملاحظه قرار گرفته و استفاده از مکمل‌های غذایی پروبیوتیکی در جیره آبزیان پرورشی منجر به کاهش فعالیت باکتری‌های نامطلوب و بهینه‌سازی تعادل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش شود (Mathialagan *et al.*, 2018).

تحقیقات متعددی در مورد اضافه نمودن مکمل‌های پروبیوتیکی و پری‌بیوتیکی به غذای آبزیان صورت گرفته است که هر کدام می‌تواند پتانسیل کاربردی داشته باشد ولی استفاده از مکمل ارزانتر و در دسترس‌تر با اثرات نسبی قابل قبول وجه تمایز بوده و سرنوشت تحقیق و عملیاتی شدن هر کدام از این مکمل‌ها را مشخص خواهد کرد. به طوری که در برخی تحقیقات با افزودن پری‌بیوتیک لاکتوسوکروز به جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نتیجه‌گیری شد که این نوع پری‌بیوتیک به میزان خیلی کمی توسط جمعیت میکروبی روده این ماهیان مورد مصرف قرار گرفته‌است (Dautremepuits *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای دیگر، تاثیر اینولین، الیگوفروکتوز و لاکتوسوکروز در سطح ۲ درصد جمعیت باکتریایی روده در لارو ماهی کفشک نشان داد

ماده بر فلور روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به خصوص در دز ۰/۲۵ درصد در قیاس با گروه کنترل بسیار چشمگیر بود و هم جمعیت کلی میکروبی و هم جمعیت لاکتوباسیل‌ها به طور چشمگیری افزایش یافت، ضمناً در دز ۰/۵ درصد نیز تفاوت معنی داری در جمعیت هر دو گروه باکتری‌ها با گروه کنترل مشاهده شد.

همچنان‌که در بررسی دیگری با اضافه کردن اینولین به میزان ۱ تا ۳ درصد جیره در فیل ماهیان جوان پرورشی مشخص شد که در ماهیان تغذیه شده با اینولین به میزان یک درصد، تعداد لاکتوباسیلوس‌های روده به طور معنی داری در مقایسه با سایر تیمارها بالاتر بود (اکرمی و همکاران، ۱۳۸۹). که نتایج آن در راستای نتایج بررسی حاضر می‌باشد.

نتایج نشان داد در تیمارهای ۱ و ۰/۵ درصد در مقایسه با تیمار ۰/۲۵ درصد جمعیت هر دو گروه باکتری کل روده و لاکتوباسیل‌ها به شکل چشمگیری کمتر بود. همچنین جمعیت کل باکتری‌های روده در گروه تغذیه شده با ۱ درصد جیره روزانه کیتوزان تفاوتی با جمعیت کل باکتری‌های گروه کنترل نداشت. دلیل این امر را می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان در غلظت‌های بالا نسبت داد.

به طوری که در یک مطالعه تاثیر کیتوزان در مقادیر مختلف بر روی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان بررسی شد و نتایج حاصله ثابت کرد که مصرف کیتوزان در گروه‌های تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان در ماده غذایی تفاوت معنی داری با گروه شاهد داشت. ضمناً از نظر شاخص‌های مربوط به عملکرد تفاوت‌های آشکاری در هفته‌های مختلف بین گروه تیمار ۰/۵ درصد با سایر گروه‌ها وجود داشت که این

بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که گروه تغذیه شده با مقدار ۲ درصد کیتوزان در ماده غذایی تفاوت معنی داری در افزایش مقاومت و زنده مانی نسبت به سایر گروه‌ها را دارا بود (Magsood *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری اثرات کیتوزان بر رشد، زنده‌مانی، فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی و پاسخ‌های سیستم ایمنی در کپور بزرگ هندی بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که بالاترین میزان مقاومت در گروه تغذیه شده با مقدار ۱ درصد کیتوزان در ماده غذایی بود (Aathi *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای به تاثیر کیتوزان و باسیلوس کوآگولانس بر روی رشد، زنده مانی و سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی کویی پرداخته شد و نتایج حاصله نشان داد که استفاده از این دو باعث اثر سینرژیستی شده و میزان رشد و زنده مانی و پاسخ‌های سیستم ایمنی را نسبت به گروه شاهد افزایش داد (Lin *et al.*, 2012).

بدیهی است نتایج مختلف و متنوع حاصل از این مطالعات زمانی در آبروی پروری اجرایی خواهد شد که تامین مکمل غذایی توجیه اقتصادی داشته و نتیجه چشمگیری به دنبال مصرف آن حاصل شود در غیر اینصورت در رقابت با سایر مکمل‌ها کنار گذاشته می‌شود.

اثر کیتوزان در صنعت آبروی پروری به عنوان یک ماده محرک ایمنی و محرک رشد در تحقیقات مختلف ثابت شده است و استفاده از آن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان معمولاً با دز ۰/۲۵ درصد از غذای روزانه پیشنهاد شده است (مدبری و همکاران، ۱۳۹۲). در این مطالعه مجدداً تاثیر کیتوزان بر روی فلور روده ماهی قزل‌آلا مشخص شد و اثرات پری‌بیوتیکی آن نمایان‌تر شد، بطور کلی نتایج این بررسی نشان داد که تاثیر این

باعث رشد بیشتر و کاهش ضریب تبدیل غذایی در گونه کپور معمولی تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا شد (اکبری و یوسفی، ۱۳۹۶)

هر چند کیتوزان به عنوان محرک ایمنی در برخی گونه‌های آبزیان آثار مثبت و معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه نشان داده است، اما تمام گونه‌هایی که تاکنون در تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف، کیتوزان دریافت نموده‌اند، افزایش رشد مثبت و رضایت بخشی را نشان نداده‌اند. به عنوان مثال، در بررسی انجام‌شده در ماهیان سیم قرمز، مار ماهی ژاپنی و ماهی دم زرد با جیره حاوی ده درصد کیتین، کیتوزان سلولز تأثیری بر رشد این ماهیان دیده نشد (Kono et al., 1987). به‌طور کلی دلیل مغایرت نتایج را نیز می‌توان به عواملی نظیر اختلاف در روش استحصال کیتوزان، تفاوت فیزیولوژی گونه ماهی مورد بررسی، تفاوت گونه سخت پوستی که کیتوزان از آن استخراج شده و میزان خلوص کیتوزان حاصل نسبت داد.

در نهایت با توجه به بالاتر بودن میزان جمعیت باکتری‌های مورد بررسی در روده ماهیان تیمار ۳ نسبت به سایر گروه‌ها و هم‌چنین تفاوت معنی‌دار این تیمار در شاخص‌های عملکردی در قیاس با گروه کنترل می‌توان دز ۰/۲۵ درصد کیتوزان را به عنوان بهترین دز مصرفی در ماهی قزل‌آلا پیشنهاد داد. علاوه بر این در بحث حلال‌ها در اکثر مطالعات از اسید استیک در کنار آب به عنوان حلال استفاده شده است با این وجود در این تحقیق به منظور مخلوط کردن کیتوزان با غذا صرفاً از آب به عنوان حلال استفاده شد که قدری کار تهیه غذای روزانه را سخت می‌کرد و نهایتاً در سطح پلت‌ها کیتوزان به صورت دانه‌های گرانوله قرار می‌گرفت که این امر می‌تواند منجر به پرت شدن مقداری از کیتوزان

تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (طافی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین در یک بررسی مقاومت ماهی قزل‌آلا تغذیه شده با مقادیر متفاوت کیتوزان در آلودگی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا پرداخته شد و نتایج حاصله نشان داد که گروه تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان در ماده غذایی تفاوت معناداری در افزایش مقاومت در مقایسه با سایر گروه‌ها دارند (مشکینی و همکاران، ۱۳۹۱).

به همان منوال در یک بررسی مشخص شد که قزل‌آلای جویباری که با کیتوزان مورد تزریق قرار گرفته و یا در محلول حاوی کیتوزان حمام داده شده بود در برابر آلودگی با باکتری آئروموناس سالمونیسیدا مقاومت بیشتری داشت (Anderson and Siwicki, 1994).

تحقیق حاضر نشان داد که نرخ رشد ویژه در تیمار ۳ مشخصاً تفاوت معنی‌دار داشته و با تیمارهای ۱ و ۲ فاصله زیادی ایجاد کرده است؛ ولی در همه تیمارها افزایش نرخ رشد ویژه را شاهد هستیم؛ ولی تأثیر کیتوزان در غلظت‌های بالا بر جمعیت میکروبی می‌تواند بر روند رشد تأثیر منفی ایجاد نماید. همچنین با نگاهی به ضریب تبدیل غذایی مشخص خواهد شد که با نرخ رشد ویژه در یک راستا بوده و در تیمار ۳ کمترین مقدار و در کنترل بیشترین مقدار را دارد و به همان دلایلی که نرخ رشد ویژه در تیمارهای مختلف دچار نوسان شده ضریب تبدیل غذایی نیز تغییرات داشته و با افزایش دز کیتوزان بالانس میکروبی روده در جهت کارایی کمتر و در نتیجه هضم و جذب کمتر حرکت میکند که نتایج در راستای برخی پژوهش‌های صورت گرفته می‌باشد، به‌طوری‌که در یک بررسی گزارش شد که کیتوزان با افزایش هضم و جذب غذا

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

### منابع

۱. اسمعیلی راد، ا.، علیشاهی، م.، زراعی، م.، قربانپورنجف آبادی، م.، ۱۳۹۱. بررسی اثر خوراکی کیتوزان بر مقاومت ماهی کپور معمولی در برابر عفونت با باکتری آئروموناس هیدروفیلا. هفدهمین کنگره دامپزشکی.
۲. اکبری، پ.، یوسفی، آ.، ۱۳۹۶. تاثیر مکمل غذایی کیتوزان بر رشد، خون شناسی، بیوشیمی سرم خون و ایمنی ذاتی ماهی کفال خاکستری، تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک، شماره ۱۱۶
۳. شاهسونی، د.، موثقی، ا.، ۱۳۸۱. آسیب شناسی سیستماتیک ماهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۶۸.
۴. طافی، ع.ا.، مشکینی، س.، تکمه چی، ا.، ۱۳۸۹. تاثیر کیتوزان بر رشد، بازماندگی و پاسخ های ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان. پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد از دانشگاه ارومیه. صفحات: ۱۸-۴۳.
۵. کلباسی، م.ر.، عبدالله زاده، ا.، سالاری جو، ح.، ۱۳۹۱. تاثیر نانو ذرات نقره کلوئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷(۲)، ۱۸۱-۱۸۹.
۶. مخیر، ب.، ۱۳۸۵. بیماری های ماهیان پرورشی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۶۳۸.

مصرفی گردد. علت این انتخاب تاثیر منفی احتمالی اسیداستیک بر روی جمعیت میکروبی فلور روده بود (Clerton *et al.*, 2001). نهایتا به نظر می‌رسد هم به دلیل خنثی نشدن اثر پری بیوتیکی کیتوزان و هم به طور کلی به منظور جلوگیری از مسمومیت احتمالی ناشی از مصرف کیتوزان، استفاده از آب به عنوان حلال منطقی تر است. از طرفی مطالعه‌ای به منظور تعیین میزان ایمن بودن کیتوزانی که برای سم زدایی کردن آب استفاده شده در ماهی انجام گرفته و نتایج نشان داده که کیتوزانی که تنها حلالش آب بوده از ایمنی بالایی برخوردار است در حالی که کیتوزانی که به منظور حل کردنش از اسیداستیک ۱ درصد استفاده شده باعث ایجاد مسمومیت شدید و کشنده‌ای شده است (Gopalakannan and Arul, 2006).

با توجه به موارد فوق‌الذکر در مطالعات بعدی میتوان کیتوزان را با پروبیوتیک‌های مختلف به صورت همزمان مورد استفاده قرار داد تا نتایج احتمالی سین بیوتیکی اینها به دست آید و با کارهای مولکولی سویه باکتری‌های افزایش یافته مشخص شده و با انجام مطالعات تکمیلی به منظور یافتن روش‌های کم هزینه تر و تولید صنعتی کیتوزان با قیمت مناسب می‌توان در این راستا چشم‌انداز مناسبی را متصور شد، علاوه بر آن تاثیر مثبت کیتوزان به ویژه در دز ۰/۲۵ درصد بر فاکتورهای عملکردی و سوق دادن جمعیت میکروبی روده به سمت لاکتوباسیل‌ها در روده ماهی قزل آلا و با توجه به فراوانی منابع کیتین و توجیه اقتصادی تولید آن، استفاده عملی از کیتوزان هم به عنوان محرک رشد و ایمنی و هم به عنوان پری بیوتیک در سطح مزارع پرورش ماهی کشور را می‌توان توصیه کرد.

۱۵. Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacois, S. and Verent, G., 2003. Immunology Related perturbations induced by copper and chitosan in carp (*Cyprinus carpio*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 47, 370-378.
۱۶. Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacois, S. and Verent, G., 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio*) by *Ptychobphthriom sp.* (Cestod). Aquatic Toxicology, 68, 325-338.
۱۷. Giannenas, I., Triantafillou, El., Stavarakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., Karagouni, E., 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 353, 26-32.
۱۸. Gibson, R., Roberfroid B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. the Journal of Nutrition, 125(6), 1401-1412.
۱۹. Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole and immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophyla* infection in pond. Aquaculture, 255, 179-187.
۲۰. Hardy, R. W., 2002. Nutrient requirement and feeding of fish for aquaculture, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom. pp: 184-202.
۲۱. Hoffman, L., Johanson, A., Steiro, K., Gildberg, A., Stenberg, E. and Bogwald, J., 1997. Chetooligosaccharides stimulate Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., head kidney leucocytes to enhanced superoxide anion production in vitro. Comparative Biochemistry Physiology, 118, 105-115.
۲۲. Huang, S. S., FU, C. H. L., Higgs, D. A. Balfry, S. K., Schulte, P. M. and Brauner, C. J., 2008. Effect of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ion regulatory development of spring Chinook salmon parr
۷. مدبری، ع.، آذری تا کامی، ق.، بهمنش، ش.، خارا، ح.، ۱۳۹۲. تاثیر مقادیر مختلف زیست یار حیاتی باکتوسل در جیره غذایی قزل آلائی رنگین کمان بر فاکتورهای رشد و فلور باکتریایی. توسعه آبی‌پروری، ۷(۴)، ۷۷-۸۷.
۸. مشکینی، س.، آق، ن.، عاصم، ع.، ۱۳۹۱. بررسی اثرات تغذیه قزل آلائی رنگین کمان با لوامیزول بر مقاومت در برابر استرس تراکم. هفدهمین کنگره دامپزشکی.
9. Aathi, K., Ramasubramanian, V., Uthayakumar, V. and Munirasu, S., 2013. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of indian major carp *Labeo Rohita*. International research journal of pharmacy, 4(5), 141-147.
10. Ainsworth, A. J., Mao, C. P. and Boyle, C. R., 1994. Immune responses enhancement in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using b- glucan from *Schizophyllum commune*. Modulators of fish Immune Responses, Vol. 1, SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp: 67-81.
11. Amiri, M.S., Yousefian, M., 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. African Journal of Biotechnology, 8(25), 7313-7318.
12. Anderson, D. P. and Siwicki, A. K., 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicidae* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan b injection or immersion. Fish Culture, 56, 258-261.
13. Bricknell, I., Dalmo, R., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish & Shellfish Immunology, 19(5), 57-72.
14. Clerton, P., Troutaud, D., Verlha, V., Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11, 1-13.

- (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 274, 109-117.
23. Jana, S., and Jana, S., 2020. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems, *Functional Chitosan*. 2020 Mar 6: 457–489,
  24. Kim, S. K. and Rajapakse, N., 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (cos). *Carbohydrate polymers*, 62, 357-368.
  25. Kono, M., Matsui, T. and Shimizo, C., 1987. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nippon suisan Gakkaishi*, 53, 125-129.
  26. Lin, SH., Mao, SH., Guan, Y., Luo, L., Lou, L. and Pan, Y., 2012. Effect of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342-343(1), 36-41.
  27. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., and Okoh, A., 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications *Molecules*, 23(4), 795.
  28. Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M. H. and Khansaheb Balange, A., 2010. Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research*, 2, 77-85.
  29. Mathialagan, K., Manickam, R., Pachiappan. P., 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu*. *Aquaculture Report*, 11, 59-69.
  30. Panesar, S., Shweta, K., and Panesar, R., 2013. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 345-364.
  31. Staykov, Y., Spring P., Denev S. and Sweetman, J., 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15, 153–161.