

مطالعه اثر پدیکوکوس پنتوساسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) بر ساختار هیستومورفومتری روده بچه ماهی قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

• جواد صادقي نژاد (نویسنده مسئول)

گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

• سيد جواد ابوالقاسمی

گروه شیلات، واحد تالش، دانشگاه آزاد اسلامی، تالش، ایران

• علیرضا شناور ماسوله

موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، رشت، ایران.

• نرگس زادسر

دانش آموخته دوره دکترای حرفه ای دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۶-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۷-۲۷

Email: sadeghinezhad@ut.ac.ir



چکیده

در دهه اخیر مطالعات زیادی در رابطه با ارزیابی اثرات پروبیوتیک ها در ماهیان صورت گرفته است و اثرات مثبت آن بر روی پارامترهای رشد و سلامت ماهیان گزارش شده است. قزل آلاي رنگين کمان از گونه های پرورشی محسوب می شود که از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه بچه ماهی قزل آلاي رنگين کمان در یک گروه کنترل (بدون باکتری در غذا) و سه گروه تیمار با پودر باکتری پدیکوکوس پنتوساسئوس با شمارش 10^8 باکتری (CFU) به میزان ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گرم باکتری به ازای هر تن غذا استفاده شد. پس از گذشت ۸ هفته از دوره آزمایش، نمونه های بافتی روده از قسمت های مختلف برداشت و در فرمالین ۱۰ درصد ثابت سازی شد. پس از آماده سازی بافتی، رنگ آمیزی مقاطع به کمک هماتوکسیلین-اُوزین و تری کروم ماسون صورت گرفت. نتایج نشان داد که پارامترهای هیستومتری نظیر ارتفاع و عرض پرز در روده قدامی و میانی گروه های تیمار خصوصا گروه ۴۰۰ گرم باکتری به ازای هر تن غذا نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ($p < 0.05$) داشته است. لذا بنظر می رسد پروبیوتیک پدیکوکوس پنتوساسئوس می تواند تاثیرات مثبت روی رشد و تکثیر بافت روده داشته و منجر به افزایش سطح جذب و رشد بچه ماهیان قزل آلا گردد.

کلمات کلیدی: پدیکوکوس پنتوساسئوس، پروبیوتیک، مورفولوژی، روده، قزل آلاي رنگين کمان

• Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 232-245

Study of *Pediococcus pentosaceus* effect on histomorphometrical structure of intestine in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

By: Sadeghinezhad, J., (Corresponding Author) Department of basic sciences, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Abolghasemi, S. J., Department of Fisheries, Talesh Branch, Islamic Azad University, Talesh, Iran. Shenavar Masouleh, A. R., Department of Aquatic Animal Health, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. and Zadsar, N., Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Email: sadeghinezhad@ut.ac.ir

Received: 2016-08-25 Accepted: 2016-10-18

In recent decades, many studies have been conducted evaluating the effects of probiotics in fish. Its positive effects on growth performance and the health of fish have been reported. Rainbow trout is one of the aquaculture species which is important in economic aspect. Juvenile rainbow trout were used in one control group (without bacteria in food) and three treatment groups with 10^8 CFU/g *Pediococcus pentosaceus* in different doses of 200,300,400 g/ 1000 kg food were used in this study. After eight weeks, tissue samples from different parts of the intestine have been taken and then fixed in 10 % formalin. Then, tissue passages were stained with hematoxylin-eosin, and Masson's trichrome. The results showed that histometrical values like height and width of the villi in anterior and middle intestine of treatment groups especially in 400 g bacteria / 1000 kg food was significantly ($p < 0.05$) increased in comparison with that of control group. It seems that *Pediococcus pentosaceus* caused positive effects on proliferation and growth of the intestine tissue which lead to increase of absorption surface area and growth of the juvenile rainbow trout.

Key words: *Pediococcus pentosaceus*, probiotic, morphology, intestine, rainbow trout

مقدمه

پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند و در زمانی که به مقدار مناسب تجویز گردند منجر به ایجاد حفظ سلامت در میزبان می‌شوند (۲۴). بیماری‌های باکتریایی بعنوان یک عامل مهم مرگ و میر در صنعت آبی پروری مطرح می‌باشد (۱۴). کنترل پاتوژن‌های باکتریایی در مزارع پرورش ماهی بوسیله عوامل دارویی شیمیایی صورت می‌گیرد که با وجود سویه‌های باکتری مقاوم در عمل درمان دارویی ضدباکتریایی موفقیت‌آمیز نمی‌باشد (۳۴). از این رو استفاده از جایگزین‌های مناسب نظیر پروبیوتیک‌ها جهت پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی و نیز بهبود تولید در صنعت آبی‌پروری مدرن ضروری است (۳). در دهه اخیر مطالعات زیادی در رابطه با ارزیابی اثرات پروبیوتیک‌ها در ماهیان صورت گرفته است و اثرات مثبت آن بر روی پارامترهای رشد و سلامت ماهیان مورد تایید قرار گرفته است (۸). بخش عمده‌ای از این مطالعات مربوط به استفاده از پروبیوتیک‌ها در مقابل عوامل پاتوژن در گونه‌های مختلف ماهی بوده است (۳۶ و ۱۶). برخی از مطالعات نیز در رابطه با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در حفظ و ارتقای سیستم دفاعی ماهیان صورت گرفته است (۳۰ و ۲۳). مطالعاتی نیز در رابطه با بهبود

تغذیه‌ای با استفاده از پروبیوتیک‌ها نیز صورت گرفته است و مشخص شده است که پروبیوتیک‌ها با افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید منجر به ارتقای فعالیت‌های آنزیمی میکروبی و گوارشی می‌شوند که افزایش هضم مواد غذایی و رشد ماهی را به دنبال دارد (۷). امروزه مشخص شده است که پوست، آبشش‌ها و دستگاه گوارشی از مهم‌ترین راه‌های ورود عوامل پاتوژن در ماهیان محسوب می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک که جزئی از فلور دستگاه گوارش هستند در سلامت ماهیان بسیار حائز اهمیت هستند و از طریق رقابت برای محل‌های اتصال باکتری‌های پاتوژن و نیز تولید ترکیبات آنتاگونیست در کنترل تشکیل کلنی‌های عوامل پاتوژن و در نتیجه سلامت ماهیان نقش دارند (۲۸ و ۱۹). از طرف دیگر روده در هضم و جذب مواد غذایی نقش بسزایی دارد (۲۶) و پروبیوتیک‌ها می‌توانند با تولید متابولیت‌هایی مانند ویتامین‌ها، اسیدهای ارگانیک، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و آنزیم‌های گوارشی منجر به افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی شوند (۲۰ و ۱۰).

در تحقیقات قبلی که در رابطه با اثر پروبیوتیک‌ها بر روی روده صورت گرفته است تغییرات مثبت آن در پرزها و چین‌های مخاطی

از آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه جهت تفکیک باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر رشد آن‌ها در محیط کشت مایع MRS در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ سانتی‌گراد، شوری ۶/۵ درصد، اسیدیته ۴/۴ و ۹/۶ استفاده گردید. به منظور مطالعه مولکولی باکتری‌ها، در ابتدا DNA ایزوله‌های خالص با استفاده از کیت Biospin شرکت BioFlux مورد استخراج قرار گرفت. بر اساس دستور العمل کیت، کلنی‌های خالص گرم مثبت در ۱۰۰ میکرولیتر EL بافر حل شدند و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر RS و ۱۰ میکرولیتر از محلول PK اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر GA اضافه گردید و به مدت یک دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی به تیوب جدید ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر BA اضافه گردید. این محلول به ستون انتقال یافت و به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع عبور یافته از ستون دور ریخته شد و سپس با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر G به ستون، مجدداً به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ انجام گرفت. با تخلیه مجدد مایع عبور یافته از ستون، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو به ستون اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ تکرار گردید. مایع عبور یافته از ستون جدا گردید و مرحله قبل با استفاده از بافر شستشو مجدداً تکرار شد. سپس با انجام سانتریفوژ به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰، ستون به تیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل انتقال یافت و ۱۰۰ میکرولیتر بافر Elution اضافه گردید و به مدت یک دقیقه در دمای اطاق قرار داده شد. پس از این مرحله، به مدت یک دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ انجام و ستون خارج گردید و بافر حاوی DNA استخراج یافته در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه کمیت و کیفیت DNA استخراج شده باکتری‌ها به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND ۱۰۰۰ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت است) و الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. DNAهایی که از کیفیت مناسب برخوردار بودند برای انجام آزمایش PCR انتخاب شدند. برای انجام آزمایش PCR از یک جفت پرایمر عمومی شناسایی باکتری‌ها (Lane, ۲۰۰۱) برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA به شرح زیر استفاده گردید:

بصورت توصیفی گزارش شده است اما منابع در خصوص مطالعه دقیق بافتی لایه‌های مختلف روده و هیستومورفوفتری آن محدود است (۱۸۹ و ۱۹۰ و ۲۴ و ۲۷). قزل‌آلای رنگین کمان از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در مناطق مختلف محسوب می‌شود که از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس بعنوان یکی از باکتری‌های گروه اسیدلاکتیک بر روی هیستومورفوفتری قسمت‌های مختلف روده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت پدیوکوکوس پنتوساستوس

در این تحقیق از باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس (JF831149) که از روده تاس ماهی ایرانی استان گیلان جداسازی و پس از تشخیص مولکولی در ژن بانک آمریکا (NCBI) ثبت شد مورد استفاده قرار گرفت. خاصیت پروبیوتیکی این باکتری قبلاً در *Acipenser baerii* و *Acipenser persicus* بررسی شده است. بطور خلاصه برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از روده ماهیان از روش Merrifield و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییرات استفاده شد (۳۲، ۲۱، ۱۸).

پس از تشریح روده و تخلیه محتویات آن، سه بار با سرم فیزیولوژی مورد شستشو قرار گرفت. پس از توزین آن در داخل ظروف شیشه‌ای استریل، سرم فیزیولوژی جهت تهیه رقت مورد نظر به آن اضافه گردید. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر در مراحل بعدی، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط کشت اختصاصی جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک MRS به صورت سطحی کشت انجام شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت در شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند و پس از طی زمان انکوباسیون، باکتری‌ها مورد جداسازی و تشخیص مولکولی انجام گرفت. باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس (JF831149) توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۳) مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفت (۳۳). در واقع پس از طی زمان انکوباسیون، شمارش باکتری‌ها بر اساس مشخصات فنوتیپی و بر حسب CFU (Colony Forming Unit) انجام و تعیین درصد فراوانی باکتری‌ها نیز پس از تشخیص مولکولی انجام گرفت. پس از رنگ‌آمیزی گرم و اطمینان از خالص بودن باکتری‌ها،

جدول ۱- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین کمان بر پارامترهای بیومتریک. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می‌باشد.

پارامترهای بیومتری	گروه تیمار ۱	گروه تیمار ۲	گروه تیمار ۳	گروه کنترل
طول (سانتی متر)	۲۲/۵۶±۰/۷۱ ^b	۲۳/۲۶±۰/۱۸ ^b	۲۲/۷۲±۰/۲۵ ^b	۲۰/۹۲±۰/۲۹ ^a
وزن (گرم)	۱۳۲/۲۸±۵/۱۲ ^b	۱۳۶/۱±۲/۳۳ ^b	۱۳۹/۸۹±۴/۱۸ ^b	۹۷/۹۷±۳/۷ ^a

داده‌ها بر اساس Mean ± SE بیان شده است. حروف غیر مشابه در هر ردیف نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

تهیه مقاطع بافتی و مطالعه هیستومورفومتری

ماهیان پس از دوره تیمار ۸ هفته، با استفاده پودر گل میخک آسان کشی و زیست‌سنجی (اندازه‌گیری طول و وزن) صورت گرفت. بلافاصله پس از باز کردن محوطه شکمی، روده از آن خارج شد. سپس نمونه‌های بافتی به فاصله دو سانتی‌متر از هر قسمت از روده (روده قدامی، میانی و خلفی) برش داده شده و در فرمالین ۱۰ درصد جهت ثبوت غوطه‌ور شدند. پس از آن مراحل آماده‌سازی و پاساژ بافتی (آبگیری، شفاف‌سازی و غوطه‌ورسازی در پارافین) صورت گرفته و قالب‌های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۶ میکرومتری از قالب‌ها تهیه و گسترش‌های بافتی بوسیله هماتوکسیلین-اؤزین و تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و نرم‌افزار (Axiovision (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) هیستومورفومتری گسترش‌های بافتی صورت گرفت. ارتفاع چین‌های مخاطی، عرض چین‌های مخاطی، ضخامت اپیتلیوم، لایه پارین-زیرمخاط، طبقه عضلانی، سروز در هر قسمت از روده اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری چین‌های مخاطی در ۵ چین در هر مقطع صورت گرفت و در هر چین نیز میانگین اندازه‌های قسمت قاعده‌ای، میانی و راسی محاسبه شد. سایر معیارهای هیستومتری نیز در ۵ میدان دید تصادفی در هر مقطع صورت گرفت.

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یکطرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $p < 0.05$ بعنوان اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

تمامی گروه‌های تیمار بطور معنی‌داری دارای طول و وزن نهایی بیشتری نسبت به گروه کنترل بودند ($p < 0.05$). لیکن اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پودر باکتری مشاهده نشد ($p < 0.05$) (جدول ۱).

مقایسه داده‌های هیستومورفومتری روده قدامی، میانی و خلفی بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش در شکل‌های ۱-۶ نشان داده شده است. مخاط پرزها دارای بافت پوششی استوانه‌ای ساده بوده و حاوی سلول‌های جامی است (شکل ۱a, b). ارتفاع پرز روده قدامی و خلفی در گروه‌های تیمار با افزایش دوز پروبیوتیک افزایش یافته بطوریکه گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) با گروه تیمار ۳ که به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم جیره دریافت کرده بوده‌اند می‌باشد (شکل ۱a, b). این در حالی است که در روده میانی با وجود افزایش ارتفاع پرز در گروه‌های تیمار با افزایش دوز پروبیوتیک، اختلاف معنی‌داری در ارتفاع پرز گروه کنترل با گروه‌های تیمار مشاهده نشد (شکل ۱). مقایسه ضخامت پرز نشان داد که این پارامتر در گروه تیمار ۳ نسبت به گروه کنترل در روده میانی افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$). در روده قدامی نیز گروه تیمار ۳ نسبت به گروه تیمار ۱ ضخامت پرز بیشتری را نشان می‌دهد ($p < 0.05$) (شکل ۲).

1 - Forward sequencing primer: 27f (5'AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG)
2 - Reverse sequencing primer: 1492r (5'TACGGYTACCTTGTACGACTT)
برای انجام آزمایش PCR به شرح زیر عمل گردید: ترکیب واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR شامل ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر پرایمر F، ۲ میکرولیتر پرایمر R، ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۰/۴ Taq و ۳۵/۶ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده گردید. برای تکثیر DNA از دستگاه PCR مدل EP شرکت Eppendorf آلمان استفاده شد. چرخه‌های حرارتی PCR شامل مرحله واسرشته سازی اولیه (initial denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس مراحل واسرشته‌سازی، پهلویی‌گیری پرایمرها و بسط به ترتیب ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در انتها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بوده است. جهت بررسی محصول PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ آمیزی با ایتیدیوم بروماید انجام گردید و ژل در دستگاه مستند ساز ژل (Gel documentation) ساخت شرکت Vilber lourmant همراه با برنامه نرم‌افزاری Biocape بررسی شد. در نهایت ۱۵ میکرولیتر از محلول حاوی استخراج DNA به همراه پرایمرهای مورد استفاده برای توالی یابی دو طرفه به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت توالی‌ها با استفاده از برنامه Blast در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bi> به منظور مقایسه و تعیین درصد مشابهت نمونه‌های موجود در بانک ژن NCBI مورد استفاده قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنی از روش بکار گرفته شده توسط Tamura و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد و با روش maximum parsimony بر اساس مدل دو پارامتری Kimura و نرم افزار MEGA ۴ رسم انجام گردید.

تیمار ماهیان

تعداد ۱۲۰ عدد بچه قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از زیست‌سنجی (اندازه‌گیری وزن و طول کل) و تعیین زیتوده با دامنه وزنی ۱۳ الی ۱۵ گرم به ۱۲ عدد حوضچه بتنی هشت ضلعی با تراکم ۱۰ عدد ماهی در هر حوضچه معرفی شدند. ماهیان به مدت یک هفته با شرایط جدید پرورشی سازگاری پیدا کردند. پس از یک هفته از سازگاری ماهیان و زیست‌سنجی تمام جمعیت مورد مطالعه، در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ گروه هر کدام دارای ۳ تکرار (میانگین وزنی تیمارها در شروع آزمایش فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بود) تیمار بندی گردیده و از محصول باکتری با غلظت 10^8 CFU/g به شرح زیر غذایی گردید:

گروه تیمار ۱: ۲۰۰ گرم پودر حاوی باکتری *P. pentosaceus* به ازای هر تن غذا
گروه تیمار ۲: ۳۰۰ گرم پودر حاوی باکتری *P. pentosaceus* به ازای هر تن غذا
گروه تیمار ۳: ۴۰۰ گرم پودر حاوی باکتری *P. pentosaceus* به ازای هر تن غذا
گروه کنترل: بدون افزودن باکتری *P. pentosaceus*

ضخامت اپیتلیوم اختلاف معنی‌داری را بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار نشان نداد اما در روده میانی سیر صعودی ضخامت اپی تلیوم با افزایش دوز پروبیوتیک در گروه‌های تیمار مشاهده شد (شکل ۳).

عضله مخاطی بین پارین و زیرمخاط مشاهده نشد اما لایه متراکم متشکل از رشته‌های هم‌بندی ضخیم پارین را از زیرمخاط جدا کرده بود. زیرمخاط بصورت بافت هم‌بندی متراکم قابل مشاهده بوده است (شکل ۷c). مطالعه ضخامت پارین-زیرمخاط در روده میانی اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) بین گروه کنترل و گروه تیمار ۳ و در روده خلفی بین گروه کنترل و گروه تیمار ۲ را نشان داد اما در روده قدامی این اختلاف معنی‌دار نبوده است (شکل ۴).

طبقه عضلانی از دو لایه عضلانی حلقوی داخلی و طولی خارجی تشکیل شده بود که توسط بافت هم‌بندی از هم جدا شده بودند (شکل ۷a,b). ضخامت طبقه عضلانی در روده قدامی گروه تیمار ۳ نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). در روده میانی نیز گروه‌های تیمار ۲ و ۳ ضخامت بیشتری از طبقه عضلانی را نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($p < 0.05$) و ضخامت طبقه عضلانی در گروه‌های تیمار با افزایش میزان پروبیوتیک در جیره غذایی افزایش را نشان داد. این درحالی است که اگرچه ضخامت طبقه عضلانی در روده خلفی تمام گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما گروه تیمار اول اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل ۵).

طبقه سروزی از بافت هم‌بندی سست به‌مراه پوششی از سلول‌های مزوتلیوم تشکیل شده بود (شکل ۷b). ضخامت این طبقه در روده قدامی اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه‌های تیمار را نشان نمی‌دهد اما در روده میانی اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه تیمار ۳ و در روده خلفی با تمام گروه‌های تیمار مشاهده شد ($p < 0.05$) (شکل ۶).

بحث

در این مطالعه که بر روی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته است، ارتفاع و ضخامت پرز خصوصا در روده میانی که محل اصلی جذب مواد مغذی است در گروه‌های تیمار شده با جیره غذایی حاوی پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد که نمایانگر افزایش سطح جذب روده می‌باشد.

گزارش‌های محدودی در رابطه با تاثیر پروبیوتیک‌ها بر مورفولوژی روده وجود دارد. Ramos و همکاران، تاثیر پروبیوتیک‌های تجاری شامل *Lactobacillus*، *Enterococcus*، *Pedococcus*، *Bacillus* را در مقادیر مختلف بر روی روده قدامی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند و افزایش سطح روده قدامی و تعداد سلول‌های جامی را در گروه حاوی ۳ گرم پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره غذایی و همچنین افزایش طول پرز در گروه حاوی ۱/۵ گرم از پروبیوتیک در هر کیلوگرم جیره غذایی را گزارش کردند اما تغییرات مخرب بافتی نظیر اتصال پرزها و نیز انتشار لوکوسیت‌ها در پارین و زیرمخاط مشهود نبوده است (۲۴).

باکتری *Lactobacillus rhamnosus* در تیلپیا مورد استفاده قرار گرفته است و در مطالعه هیستومتری روده قدامی و خلفی گروه حاوی

پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل ارتفاع پرز بیشتری را نشان داد. Gunasekara و همکاران (۲۰۱۱)، با استفاده از تکنیک استریولوژی تاثیر باکتری *Aeromonas hydrophila* را بر روی تغییرات حجمی روده آرتیمیا طی تکامل مورد بررسی قرار دادند و افزایش حجم روده قدامی و خلفی را در گروه حاوی پروبیوتیک گزارش کردند (۱۵).

بطورکلی پرزها با افزایش سطح روده منجر به جذب مواد مغذی می‌شوند و هرگونه تغییر در جیره غذایی موجب بروز تغییرات در ساختار بافتی آن می‌گردد. هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک دارای اثرات مورفولوژیک متفاوت در هر یک از گونه‌های ماهیان است (۱۳).

اکثر تحقیقات در زمینه مطالعه اثر پروبیوتیک‌ها بر روی عملکرد جذبی اپی‌تلیوم روده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی جهت ارزیابی میکروویلی (۲۲) و گنجیدگی‌های لیپیدی (۱۱) صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Saenz و همکاران (۲۹) بر روی تاثیر دو سویه *Pdp11* و *Pdp12* از خانواده *Alteromonadaceae* بر روده بچه ماهی *Solea senegalensis* صورت گرفت، نشان داد که اندازه و تعداد میکروویلی در گروه پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. علاوه بر آن در گروه پروبیوتیک تعداد لوکوسیت‌ها نیز در پارین کمتر بوده است و نمای نرمال راس مخطط در میکروویلی‌ها مشهود بوده است این در حالی است که در گروه کنترل قطرات بزرگ لیپیدی در انتروسیت‌ها مشاهده شد و ضخامت راس مخطط کاهش یافته و محدوده سلولی نامشخص بوده است.

در مطالعه‌ای که توسط Ringo و همکاران در سال ۲۰۰۷، صورت گرفت باکتری‌های پاتوژن *Aeromonas salmonicida* و *Vibrio anguillarum* دارای اثرات مخربی بر روی اپیتلیوم روده نظیر تغییر شکل میکروویلی، تخریب اتصالات محکم و وجود دبری‌های سلولی در داخل مجرای لوله گوارشی بوده است اما استفاده از پروبیوتیک *Carnobacterium divergens* منجر به ترمیم و بهبودی آثار مخرب باکتری‌های پاتوژن شدند (۲۷).

Salma و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثرات باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactobacillus plantarum* را روی مورفولوژی روده خلفی *Huso huso* مورد بررسی قرار دادند و اثرات تخریبی *S. aureus* بر روی شکل میکروویلی، تخریب اتصالات محکم و وجود تعداد زیادی از لنفوسیت‌های داخل سلولی را گزارش کردند. علاوه بر آن اثرات محافظتی *L. mesenteroides* نیز در این مطالعه اشاره شده است (۳۱).

در مطالعه حاضر، افزایش ضخامت لایه‌های مختلف بافتی در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* بویژه در دوزهای بالاتر در روده قدامی و میانی که محل‌های اصلی هضم و جذب مواد غذایی در روده محسوب می‌شوند بیانگر پاسخ تطبیقی ماهی برای افزایش توان جذب مواد مغذی در داخل روده است. Gunasekara و همکاران (۲۰۱۱) افزایش تکثیر سلولی در سلول‌های پوششی و نیز طبقه عضلانی روده را علت افزایش حجم روده در گروه حاوی جیره پروبیوتیک *Aeromonas hydrophila* در روده آرتیمیا ذکر کرده اند (۱۵). Banasaz و همکاران در سال‌های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ و Abrams و همکاران در سال ۱۹۶۳، نیز افزایش تقسیم سلولی میتوزی را در روده رت متعاقب

tobacillus rhamnosus GG. *Applied and environmental microbiology* 68: 3031-3034.

6- Bagheri, T., S. A. Hedayati, V. Yayari, M. Alizade and A. Farzannfar. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish journal of fisheries and aquatic science* 8: 43-48.

7- Buts, J. P., N. De Keyser, S. Marandi, D. Hermans, E. M. Sokal, Y. H. Chae, Y. H., L. Lambotte, H. Chanteux and P. M. Tulkens. 1999. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 45: 89-96.

8- Carnevali, O., M. C. Zamponi, R. Sulpizio, A. Rollo, M. Nardi, C. Orpianesi, S. Silvi and M. Caggiano. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture international* 12: 377-386.

9- De Schrijver, R. and F. Ollevier. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186: 107-116.

10- Díaz-Rosales, P., S. Arijo, M. Chabrilion, F. J. Alarzon, S. T. Tapia-Paniagua and E. Martínez-Manzanares. 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*. *Aquaculture international* 293: 16-21.

11- Diaz, J.P., E. Guyot, S. Vigier and R. Connes. 1997. First events in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea bream. *Journal of fish biology* 51: 180-192.

12- El-Haroun, E. R., A. M. A. S. Goda and M. A. Kabir Chowdhury. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen- supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture research* 37: 1473-1480.

13- Ferguson, R. M. W., D. L. Merrifield, G. M. Harper, M. D. Rawling, S. Mustafa and S. Picchietti. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of applied microbiology* 109: 851-862.

14- Grisez, L. and F. Ollevier. 1995. *Vibrio* (Listonella) anguillarum infections in marine fish larviculture. P. 497, In: Lavens P., E. Jaspers, I. Roelands (ed.), *European Aquaculture Society, Gent (Special publication N. 24)*.

15- Gunasekara, R. A., P. Cornillie, C. Casteleyn, W. De Spiegelaere, P. Sorgeloos, P. Simoens, P. Bossier and W. Van den Broeck. 2011. Stereology and computer assisted three-dimensional reconstruction as tools to study probiotic effects of *Aeromonas hydrophila* on the

استفاده از باکتری‌های مفید گزارش کردند (۵، ۴، ۱). Rawls و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز نتایج مشابهی را گزارش اعلام کردند (۲۵). از آنجائی که پاسخ میزبان به حضور باکتری متفاوت است، مطالعات ایمنو هیستوشیمی برای ارزیابی دقیق باکتری بر روی روند میتوز و آپوپتوز سودمند است. از طرف دیگر مشخص شده است که پروبیوتیک‌ها از راه‌های مختلفی نظیر تولید آنزیم‌هایی نظیر آمیلاز، پروتئاز و لیپاز و تحریک آنزیم‌های گوارشی منجر به تسریع مراحل هضم مواد غذایی می‌شوند (۱۲، ۹، ۷).

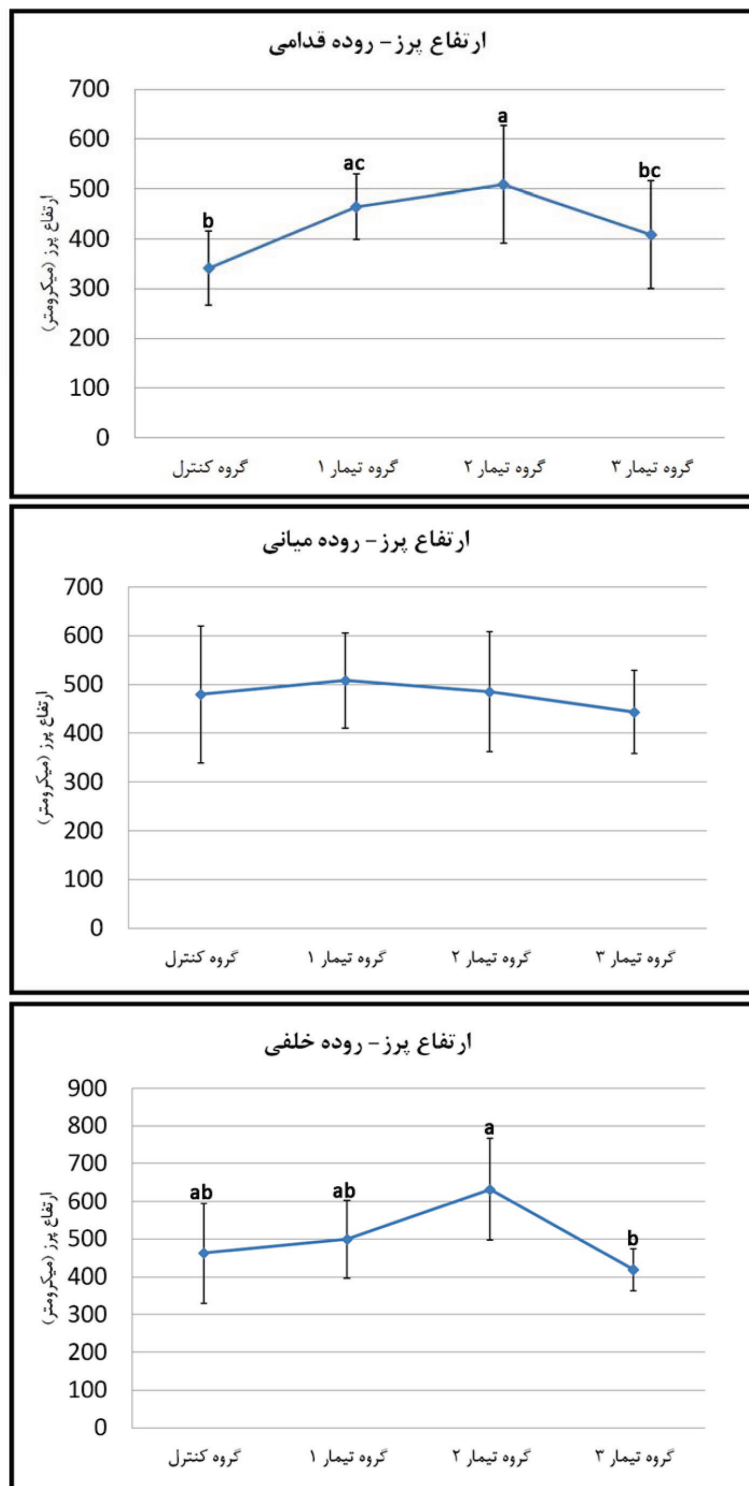
بطور کلی مطالعه مورفولوژی و هیستومتری روده برای ارزیابی عملکرد پروبیوتیک‌ها در ماهیان حائز اهمیت می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Ringo و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت نیز اهمیت مورفولوژی روده در انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک بعنوان پروبیوتیک در ماهی تاکید شده است (۲۷). با وجود این که در بسیاری از منابع گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از سایر منابع غیر از ماهیان را برای استفاده در ماهیان سودمند دانسته‌اند (۱۹۰۶)، اما Salma و همکاران در سال ۲۰۱۱، نشان دادند که باکتری جدا شده از پنیر ایرانی دارای اثرات شدید مخرب بر روی روده *Huso huso* بوده است و براین اساس ارزیابی میکروسکوپ الکترونی و نوری مورفولوژی روده را از فاکتورهای تعیین کننده در استفاده از این پروبیوتیک دانسته‌اند (۳۱).

از آنجائی که بچه ماهیان در شروع تغذیه دارای دستگاه گوارش و نیز سیستم ایمنی کاملی نمی‌باشند و در معرض عوامل میکروبی مرتبط با دستگاه گوارش می‌باشند بهبود ساختار بافتی روده در آن‌ها حائز اهمیت است (۳۵ و ۱۷). با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق می‌توان گفت باکتری *Pediococcus pentosaceus* در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ضمن رشد و تکثیر بیشتر روده منجر به بروز تغییراتی در جهت بهبود ساختار بافتی قسمت‌های مختلف لوله گوارشی شده و سبب افزایش راندمان جذب مواد غذایی خصوصاً در دوزهای بالاتر می‌گردد که با بیومتری انجام شده در پایان دوره تیمار نیز سازگار است.

منابع مورد استفاده

- 1- Abrams, G.D., H. Bauer and Sprinz, H. 1963. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Laboratory investigation* 12: 355-364.
- 2- Aubin, J., F. Gatesoupe, L. Labbe and L. Lebrun. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture research* 36: 758-767.
- 3- Balcazar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J. L. Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology* 114: 173-186.
- 4- Banasaz, M., E. Norin and T. Midtvedt. 2001. The role of gender, age and microbial status on cell kinetics in the gastrointestinal tract of mice. *Microbial ecology in health and disease* 13: 135-142.
- 5- Banasaz, M., E. Norin, R. Holma, T. Midtvedt. 2002. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with Lac-

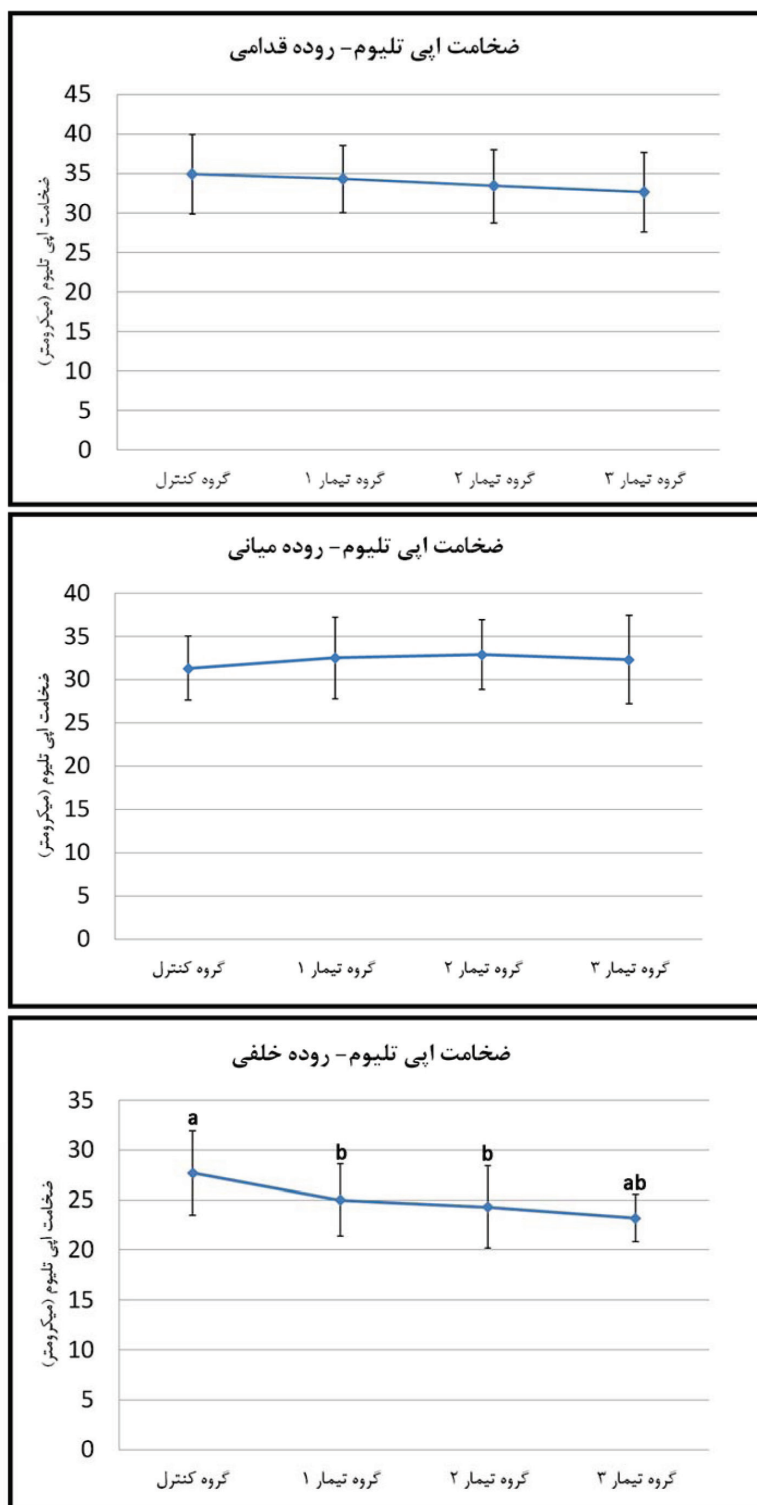
- digestive tract of germ-free *Artemia franciscana nauplii*. *Journal of applied microbiology* 110: 98-105.
- 16- Kristiansen, M., D. L. Merrifield, J. L. Gonzalez Vecino, R. Myklebust and E. Ringø, E. 2011. Evaluation of Prebiotic and Probiotic Effects on the Intestinal Gut Microbiota and Histology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of aquaculture research and development*, S1: 1-8.
- 17- Manning, M. J., M. F. Grace and C. J. Secombes. 1982. Developmental aspects of immunity and tolerance in fish. Pp. 31-46, In: Roberts, R. J. (ed.), *Microbial disease of fish*. Academic Press, London.
- 18- Merrifield, D. L., G. Bradley, G. M. Harper, R. T. M. Baker, C. B. Munn and S. J. Davies, S. J. 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 17: 73-79.
- 19- Merrifield, D. L., G. Harper, A. Dimitroglou, E. Ringø and S. J. Davies. 2010a. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture research* 41: 1268-1272.
- 20- Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker and J. Børgwald. 2010b. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302: 1-18.
- 21- Moslehi, F., M. Sattari and A. Shenavar Masouleh. 2016. Effects of *Pediococcus pentosaceus* as a probiotic on intestinal microbiota and body composition of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt, 1869. *International Journal of Aquatic Biology* 4: 10-15.
- 22- Palay, S.L. and L. J. Karlin. 1959. An electron microscopic study of the intestinal villus ii. The pathway of fat absorption. *The journal of biophysical and biochemical cytology* 5: 373-384.
- 23- Panigrahi, A., V. Kiron, T. Kobayashi, J. Puangkaew, S. Satoh, A. Reckek, K. Dierckens, S. Laureau, N. Boon, P. Bosier and W. Van den Broeck. 2009. Effect of germ-free environment on survival and gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 293: 8-15.
- 24- Ramos, M. A., J. F. Gonçalves, S. Batista, B. Costas, M. A. Pires, P. Rema and R. O. Ozório. 2015. Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish and shellfish immunology*: 45: 19-26.
- 25- Rawls, J.F., B. S. Samuel, B.S. and J. I. Gordon. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceeding of national academy of Science* 101: 4596-4601.
- 26- Ringo, E., R. Myklebust, T. M. Mayhew and R. E. Olsen. 2007a. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*: 268: 251-264.
- 27- Ringø, E., I. Salinas, R. E. Olsen, A. Nyhaug, R. Myklebust and T. M. Mayhew. 2007b. Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and tissue research* 328: 109-116.
- 28- Ringø, E., S. Sperstad, R. Myklebust, S. Refstie and A. Krogdahl. 2006. Characterisation of the microbiota associated with the intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261: 829-841.
- 29- Saenz de Rodriganez, M. A., Diaz-Rosales, P., Chabrilion, M., Smidt, H., Arijo, S., Leon-Rubio, J. M., F. J. Alarcon, M. C. Ballebona, M. A. Morinigo, J. B. Cara and F. J. Moyano. 2009. effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture nutrition* 15: 177-185.
- 30- Salinas, I., A. Cuesta, M. A. Esteban and J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish and shellfish immunology* 19: 67-77.
- 31- Salma, W., Z. Zhou, W. Wang, F. Askarian, A. Kousha, M. Tajabadi Ebrahimi, R. Myklebust and E. Ringo. 2011. Histological and bacteriological changes in intestine of beluga (*Huso huso*) following ex vivo exposure to bacterial strains. *Aquaculture* 314: 24-33.
- 32- Soltani, M., A. Shenavar Masouleh, M. Ahmadi, M. Pourkazemi, and A. Taherimirghaied. 2015. Antibacterial activity, antibiotic susceptibility and probiotic use of lactic acid bacteria (LAB) in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health* 2: 54-65.
- 33- Soltani, M., M. Pourkazemi, M. R. Ahmadi, A. Taherimighaied, D. L. Merrifield and A. S. Masouleh. 2013. Genetic diversity of lactic acid bacteria in the intestine of Persian sturgeon fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology* 29: 494-498.
- 34- Thyssen, A. and F. Ollevier. 2001. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. *Aquaculture* 200: 259-269.
- 35- Timmermans, L. P. M. 1987. Early development and differentiation in fish. *Sarsia* 72: 331-339.
- 36- Vazquez, J. A., M. P. Gonzalez and M. A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149-161.



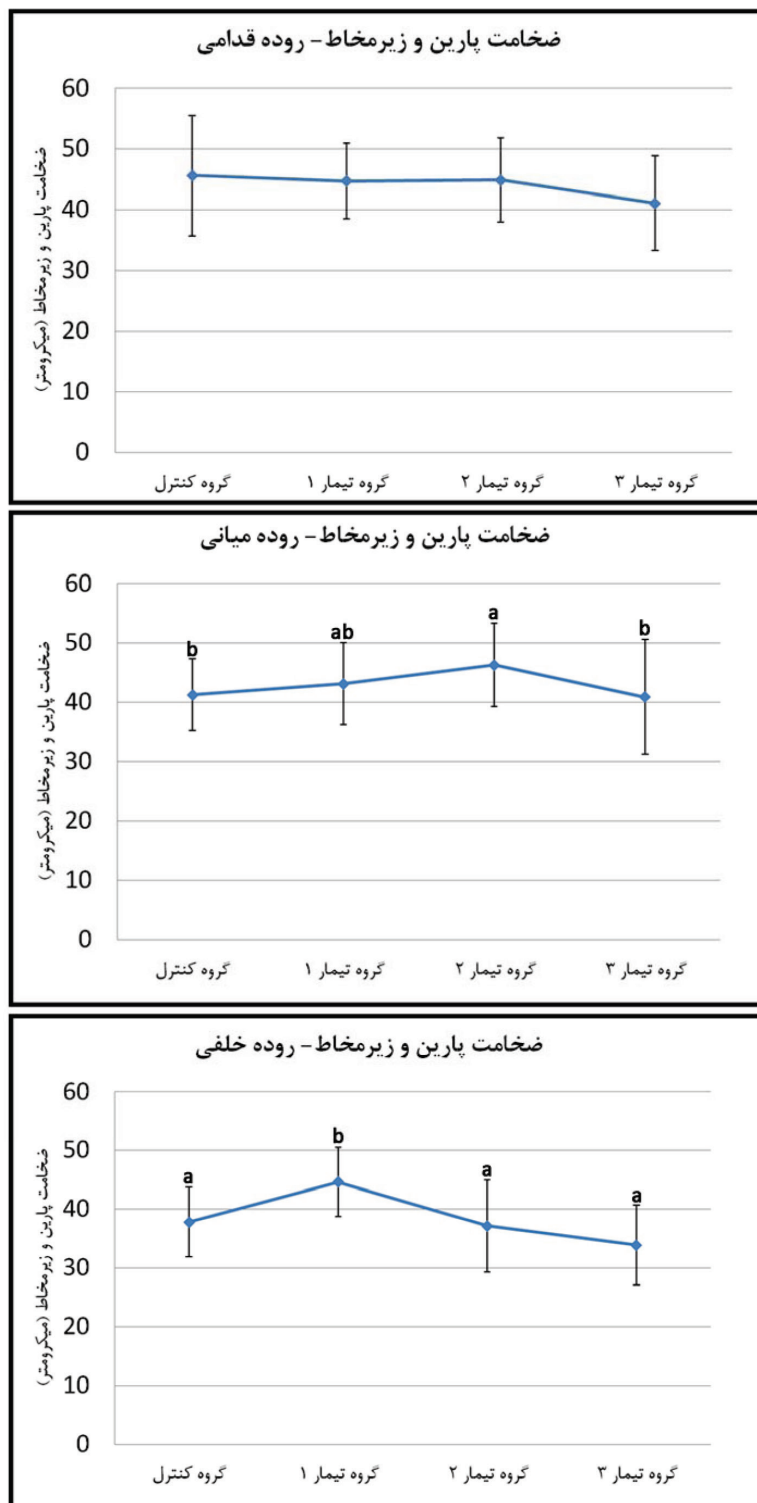
شکل ۱- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس جداسازی شده از روده قزل آلای رنگین کمان بر ارتفاع پرز قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



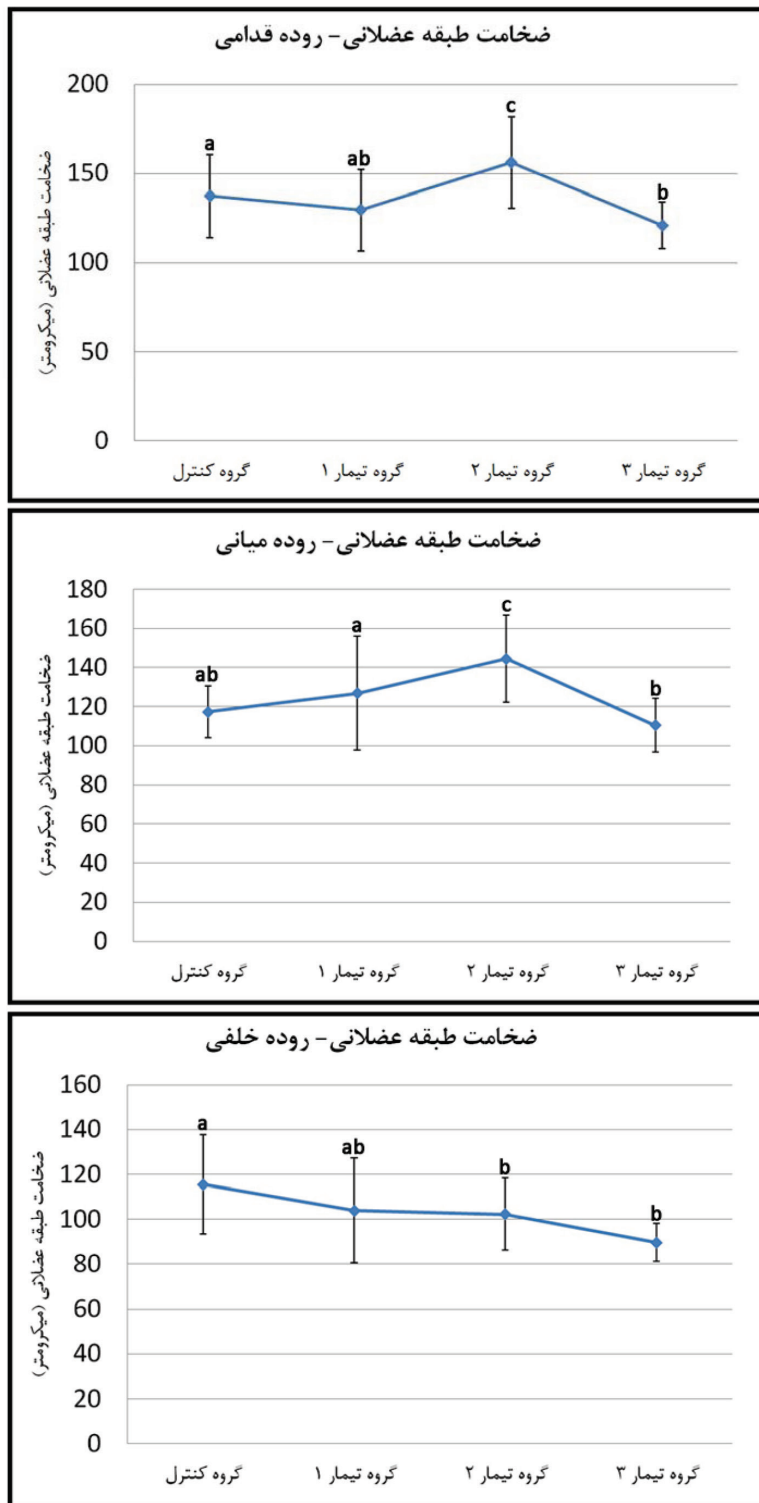
شکل ۲- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس جداسازی شده از روده قزل آلائی رنگین کمان بر ضخامت پرز قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



شکل ۳- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس جداسازی شده از روده فزل آلائی رنگین کمان بر ضخامت اپی تلیوم قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



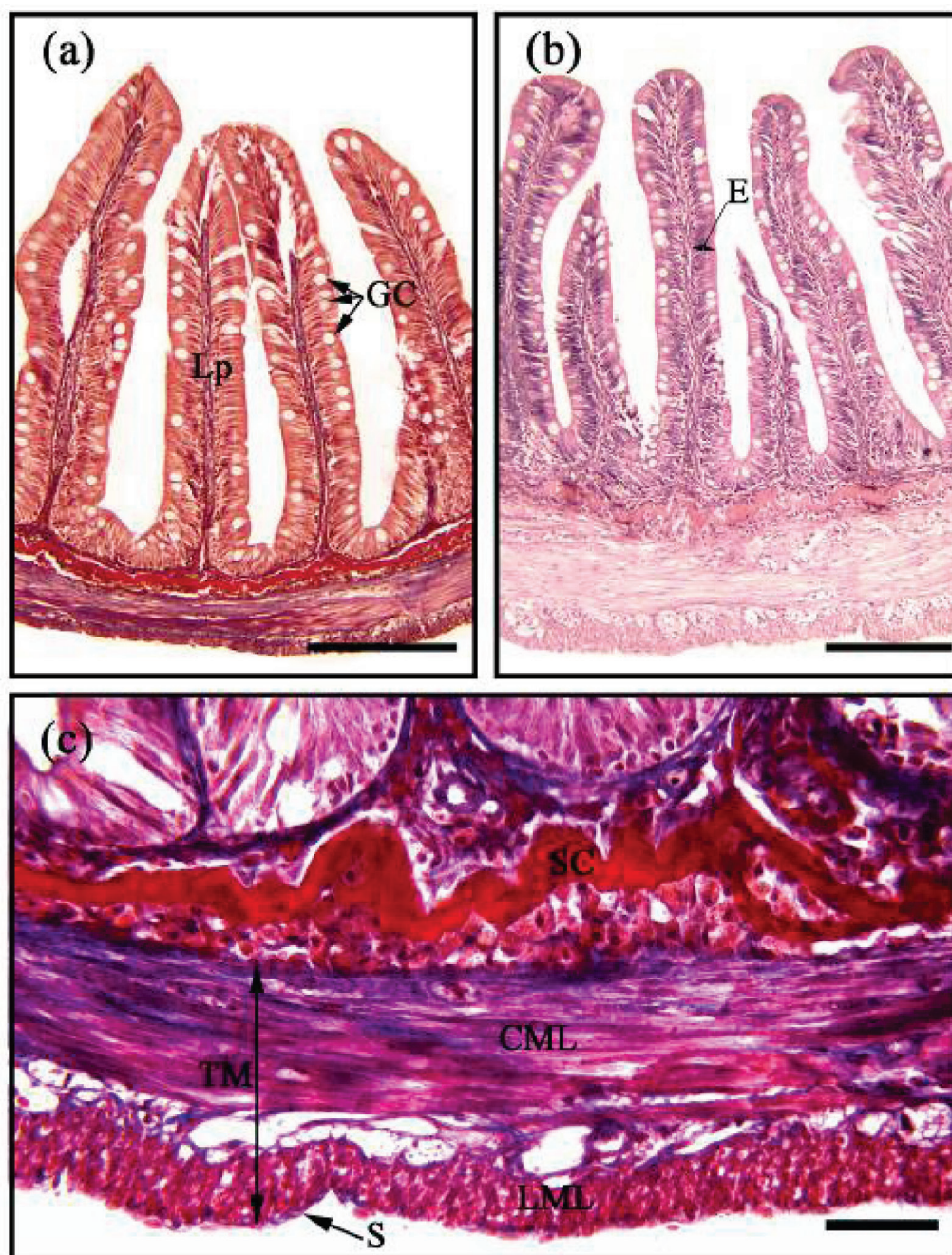
شکل ۴- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس جداسازی شده از روده قزل آرای رنگین کمان بر ضخامت پارین-زیرمخاط قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



شکل ۵- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساسئوس جداسازی شده از روده قزل آرای رنگین کمان بر ضخامت طبقه عضلانی قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



شکل ۶- تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتوساستوس جداسازی شده از روده قزل آلای رنگین کمان بر ضخامت طبقه سروزی قسمت های مختلف روده. جیره غذایی گروه تیمار اول شامل ۲۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره، گروه تیمار دوم ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن، گروه تیمار سوم ۴۰۰ میلی گرم پروبیوتیک به ازای هر تن جیره و گروه کنترل فاقد پروبیوتیک می باشد (حروف غیر مشابه نمایانگر اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ می باشد).



شکل ۷- (a): مقطع عرضی روده قزل آلائی رنگین کمان در گروه کنترل (تری کروم ماسون، اندازه بار ۲۰۰ میکرومتر). (b): مقطع عرضی روده قزل آلائی رنگین کمان در گروه تیمار سوم (هماتوکسیلین-انوزین، اندازه بار ۲۰۰ میکرومتر). (c): ساختمان بافتی طبقه عضلانی روده قزل آلائی رنگین کمان در گروه تیمار دوم (تری کروم ماسون، اندازه بار ۰۵ میکرومتر). E: اپی تلیوم، GC: سلول جامی، Lp: پارین، SC: لایه متراکم، TM: طبقه عضلانی، CML: لایه عضلانی حلقوی، LML: لایه عضلانی طولی، S: سرور.