# تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی روی رشد، فاکتورهای خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر

علیرضا حسینی*؛ حسین اورجی؛ سکینه یگانه ؛ حامد شهابی

* hamedmhesh@yahoo.com

گروه علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری صندوق پستی: ۵۷۸

**تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲** **تاریخ پذیرش: تابستان ۱۳۹۳**

## چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی بر روی عملکرد رشد، پارامترهای خونی و سرمی بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) بود. بدین منظور، بچه ماهیان آزاد دریای خزر (با وزن اولیه۰/۱± ۶/۹ گرم)، به مدت ۸ هفته با به کارگیری پنج جیره شامل سطوح ۰ (شاهد) ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴گرم در کیلوگرم نگهداری شده و این آزمایش در ۵ تیمار، ۳ تکرار انجام شد. پس از پایان دوره از پارامترهای رشد ماهیان اندازه گیری شد، همچنین در انتها از ماهیان خونگیری بعمل آمد و شاخص های خونی شامل: تعداد گلبولهای قرمز، تعداد گلبولهای سفید، هموگلوبین و هماتوکریت، شاخص های بیوشیمیایی (کلسترول،گلوکز، تری گلیسرید و پروتئین کل) بررسی شد. نتایج نشان داد که ضریب تبدیل غذایی در تیمار پنجم (۰/۴ گرم پروبیوتیک) به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. ضریب رشد ویژه، وزن نهایی و افزایش وزن در تیمار سوم (۰/۲گرم) در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی اختلاف معنی‌داری در هموگلوبین، هماتوکریت و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) ایجاد نکرد. در حالی که هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و حجم متوسط گلبولی (MCV) در تیمار پنجم (۰/۴ گرم پروبیوتیک) مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش و همچنین گلبول قرمز به صورت معنی داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (P <۰/۰۵). گلبول سفید نیز با افزایش میزان پروبیوتیک تا میزان ۰/۲گرم افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که ۰/۲ گرم درکیلوگرم پروبیوتیک
مذ کور می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی مفید برای بهبود شاخص‌های رشدی ماهیان آزاد دریای خزر استفاده گردد.

**لغات کلیدی:** پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی، پارامترهای خونی، رشد، ماهی آزاد دریای خزر

---

*نویسنده مسئول



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

## مقدمه

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری یکی از سریع الرشدترین بخش‌های تولید غذا بوده است، صنعت آبزی‌پروری علیرغم این رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از آن جمله می‌توان به کنترل کیفیت آب، شیوع بیماری ها اشاره نمود، در زمینه کنترل بیماری ها، استفاده از آنتی بیوتیک ها مطرح گردید که پس از سال ها این داروها خود مشکلات عدیده ای از جمله مقاوم شدن پاتوژن ها، مسائل زیست محیطی را ایجاد نمود. در سال های اخیر استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان جایگزینی برای روش های درمانی قبلی مطرح گردیده که به نظر می رسد می‌تواند بسیاری از مشکلات را مرتفع سازد(Vazquez et al ., 2005).

استفاده از پروبیوتیک ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی پروری همگام با محیط زیست به شمار می روند. با استفاده از این مواد هم می‌توان تولید را افزایش داد، هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم اینکه می توان آنها را به عنوان مبارز بیولوژیک با میکروارگانیسم‌های آبزی مد نظر قرار داد. Gatesoupe (۱۹۹۱) تعریف جامعی از پروبیوتیک را ارئه کرد:" سلول‌های تک یاخته‌ای که از طریق ورود به روده گوارشی میزبان و دارا بودن قابلیت زنده مانی در روده، با هدف بهبود سلامتی میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرند". سابقه استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل غذایی برای حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد. در آبزی‌پروری برای اولین بار Yasuda و Taga (۱۹۸۰) پیش‌بینی کردند که باکتری‌هایی یافت خواهند شد که نه تنها به عنوان غذا بلکه به عنوان کنترل کننده‌های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال کننده‌های چرخه مواد غذایی مفید می‌باشند. در مزارع پرورش آبزیان (نرم‌تنان، سخت پوستان، ماهی) از پروبیوتیک‌ها برای بهتر کردن کیفیت محیط زیست آبزی و برای افزایش میکروفلورهای مفید در لوله گوارش ماهی از نظر تغذیه‌ای برای بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین‌ها است. تأثیر مهم دیگر پروبیوتیک‌ها کاهش میزان بروز و دوره بیماری‌ها، تقویت سیستم ایمنی و فعالیت‌های ضد ویروسی است(Fuller, 1989).

پروبیوتیک‌ها به عنوان یک استراتژی مهم برای تولید محصولات قابل تجدید از طریق کنترل بیولوژیکی و افزایش عملکرد رشد در سیستم‌های پرورشی پیشنهاد می‌گردند، به طوری که استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی که باکتری‌های مفید می باشند و یا ترکیبات تولید شده توسط آنها، با اثرات مفید بر میزبان، در آبزی‌پروری برای کنترل بیماری‌ها و همچنین به عنوان مکمل‌هایی برای بهبود رشد لاروهای ماهی استفاده شده است Austine) (Jobron .& Irianto, 2002 و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک حاوی *Carnobacterium* به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب مهار دو عامل رایج بیماری‌زا شامل *Aeromonas salmonicida* و *Vibrio anguillarum* در موکوس روده و مدفوع ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. Moriarty و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که پروبیوتیک موجب بهبود سلامتی ماهی و میگو از طریق کنترل عوامل بیماری‌زا و بهبود کیفیت آب بوسیله تغییر در جمعیت میکروبی آب و مواد بستر استخر پرورش می- شود. استفاده از یک نوع محصول تجاری حاوی باکتری و مخمر بعنوان پروبیوتیک، از طریق افزودن به غذا بصورت موفقیت‌آمیزی منجر به افزایش وزن بدن و درصد بقاء در ماهی کپور هندی گونه کاتلا شد (Mohanty *et al*., 1996). Kennedy و همکاران (۱۹۹۸) از باکتری‌های پروبیوتیک در پرورش لارو ماهیان دریایی استفاده کردند، آن‌ها از پروبیوتیک‌ها در پرورش ماهی قزل‌آلای دریایی خال‌دار، کفال مخطط استفاده نمودند و مشاهده کردند که استفاده از باکتری- های پروبیوتیک در استخرهای پرورش لارو ماهی سبب افزایش بقاء، همگونی در اندازه نرخ رشد می‌شود. از طرفی افزودن دوره ای باکتری‌ها به استخرهای پرورشی، تغییر در جوامع باکتریایی استخر و ماهی را به دنبال داشت. محمدی آذرم و همکاران (۱۳۸۳)، از پروبیوتیک پروتکسین در جیره لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کرده و اثر آن را بر رشد و زنده‌مانی لاروها مورد بررسی و گزارش کردند که بازماندگی لاروهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود. فروزانفر و همکاران (۱۳۸۵)، اثر جیره‌های غذایی



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

آغشته شده به محصول پروبیوتیکی Bioplus 2B را بر عواملی نظیر بازماندگی، رشد و کیفیت لاشه ماهی قزل‌آلا مطالعه و نشان دادند که با افزایش غلظت پروبیوتیک تغذیه‌شده، مقادیر وزن و رشد در لاروهای مذکور افزایش معنی‌داری داشتند.

ماهی آزاد دریای خزر از مهم ترین و با ارزش ترین گونه های تجاری در ایران می باشد، ذخایر این ماهی در سال های اخیر در معرض خطر انقراض می باشد، از نکات مهم در پرورش لاروی این ماهی اعمال مدیریت صحیح تغذیه و بالا بردن درصد بقاء می باشد. لارو بسیاری از جانوران آبزی در مراحل رشد اولیه به محیط خارج رها می شوند، این لاروها از لحاظ فلور میکروبی روده ای در معرض تغییرات و نوسانات زیادی قرار دارند، زیرا هنگام شروع تغذیه، حتی لوله گوارش آن ها به طور کامل توسعه نیافته است بر این اساس تیمارهای پروبیوتیک بویژه در دوران اولیه زندگی بسیار مطلوبند. با توجه به اینکه بیشتر مشکلات مربوط به بچه ماهیان آزاد در ایران به مرحله لاروی مربوط است، بنابراین این آزمایش به منظور افزایش تولید و زنده مانی بچه ماهیان آزاد انجام شد.

## مواد و روش ها

مطالعه حاضر در سالن تکثیر و پرورش دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. در این مطالعه از ۱۵ تانک با حجم ۳۰۰ لیتر استفاده شد. برای این منظور ۲۷۰ ماهی با میانگین (±SD) وزنی ۰/۱± ۶/۹ گرم (۱۸ ماهی در هر تانک) به صورت کاملاً تصادفی در پنج تیمار که هر تیمار در سه تکرار بود توزیع شدند. در طول دوره پرورش متوسط (±SD) دمای آب ۲±۱۳ درجه سانتی‌گراد، pH آب ۰/۲±۷/۶، غلظت اکسیژن ۱±۸/۶ میلی‌گرم در لیتر، غلظت آمونیاک در حد صفر و دوره نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. در دو هفته سازگاری، ماهی‌ها با استفاده از جیره شاهد و پس از آن با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی بر رشد و پارامترهای خونی و سرمی ماهیان، پنج تیمار غذایی تهیه شد. بچه ماهیان در تیمار یک، دو، سه، چهار و پنج به ترتیب میزان ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ گرم پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی به همراه ۱۰ml سرم فیزیولوژی و ml ۵ روغن مایع آفتابگردان به ازای هر کیلوگرم از جیره پایه به مدت ۵۶ روز تغذیه شدند. غذای SFT3 مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت تعاونی تولیدی خوراک دام طیور و آبزیان بهدانه شمال تهیه شد که ترکیبات آن در جدول ۱ ارائه شده است. تغذیه بچه ماهیان به صورت روزانه و در سه نوبت به میزان ۲-۲/۵٪ وزن بدن صورت گرفت. به منظور تعیین مقدار غذای بچه ماهیان، در ابتدای دوره پرورش بیومتری هر تانک صورت گرفت. توزین غذای بچه ماهیان به صورت روزانه انجام شد. درصد غذادهی روزانه در کل دوره با استفاده از جدول مخصوص میزان غذادهی با توجه به دمای آب مورد محاسبه قرار گرفت. به منظور بررسی میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی، وزن بدن ماهیان با دقت ۰/۱ گرم به فاصله ۳ هفته یک بار اندازه گیری شد. در پایان دوره ۵۶ روزه پرورش، از هر تیمار تعداد ۹ عدد بچه ماهی به طور تصادفی جهت خونگیری و سنجش فاکتورهای خونی انتخاب شد. ابتدا ماهیان توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی گرم در هر لیتر) بیهوش شدند و خونگیری از قسمت انتهایی باله مخرجی ماهیان توسط سرنگ صورت گرفت. پس از خونگیری، نمونه‌های خون جمع‌آوری شده به دو بخش تقسیم شدند:

بخش اول: نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند تا شمارش گلبول قرمز، شمارش گلبول سفید، میزان هماتوکریت صورت گیرد. شمارش گلبول قرمز و سفید خون با استفاده از لام هماسیتومتر انجام شد. اندازه گیری میزان هماتوکریت خون توسط میکروهماتوکریت صورت گرفت. همچنین میزان اندیس-های گلبولی طبق فرمول محاسبه شد.

بخش دوم: نمونه‌های خون در لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند و پس از تشکیل لخته، سرم خون با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۶۰۰۰ rpm) توسط سمپلر از لخته جداسازی شد و در میکروتیوپ های جداگانه قرار گرفت. نمونه های سرم جداسازی شده با توجه به کیت‌های آزمایشی شرکت



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

پارس‌آزمون برای اندازه گیری پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسرید مورد استفاده قرار گرفت. کلیه داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار (SD) بیان شده‌اند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری(V. 17.0) SPSS صورت گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف، مقایسه بین میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه و اختلاف بین میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری ۵٪ صورت پذیرفت.

جدول۱- آنالیز تقریبی غذای پایه مورد استفاده

| ترکیبات | مقدار بر حسب درصد |
|---|---|
| حداقل پروتئین خام | ۴۴ |
| حداقل چربی خام | ۱۳ |
| حداکثر خاکستر | ۱۳ |
| حداکثر فیبر | ۲/۵ |
| حداقل فسفر | ۱/۵ |
| حداکثر رطوبت | ۱۱ |

## نتایج

اثر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای رشد در طول ۵۶ روز دوره پرورش در جدول ۲ نشان داده شده است. در انتهای آزمایش همه ماهیان به خوبی رشد کرده و هیچ علامتی از بیماری مشاهده نشد. بر اساس نتایج به دست آمده، افزایش میزان پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی در جیره (تا میزان۰/۲ گرم پروبیوتیک) اثر معنی‌داری بر وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه گذاشت ($P\leq0.05$). با مراجعه به جدول ۲ ملاحظه می شود که بالاترین وزن نهایی مربوط به ماهیانی است که از جیره حاوی۰/۲گرم پروبیوتیک تغذیه کردند و جیره های حاوی ۰/۱ گرم پروبیوتیک و شاهد پایین‌ترین میزان را به خود اختصاص دادند. از لحاظ فاکتور ضریب تبدیل غذایی بین تیمارها تفاوت معنی داری وجود داشت و بالاترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار شاهد و کمترین مقدار در تیمار ۵ که حاوی ۰/۴ گرم در کیلوگرم پروبیوتیک بود مشاهده شد ($P\leq0.05$). ثابت رشد ویژه در ماهیان گروه سه ( تغذیه شده با ۰/۳ گرم پروبیوتیک) به طور معنی داری نسبت به تیمارهای شاهد، دو، چهار و پنج بیش تر بود ($P\leq0.05$).

اثرات پروبیوتیک بر شاخص های خونی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که پروبیوتیک اثری بر هموگلوبین، هماتوکریت، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، کلسترول و میانگین کل پروتئین ندارد ($P\geq0.05$). با این حال مقدار حجم متوسط گلوبولی (MCV) در تیمار حاوی ۰/۴ گرم پروبیوتیک بیشترین مقدار و در تیمار شاهد کمترین مقدار مشاهده شد ($P\leq0.05$). تعداد کل گلبول های سفید بچه ماهیان آزاد در جدول ۳ مشاهده نشان داده شده است. بیشترین مقدار گلبول سفید در بچه ماهی های آزاد تغذیه شده با تیمار شاهد و کمترین مقدار در تیمار پنج (۰/۴ گرم پربیوتیک) مشاهده شد ($P\leq0.05$). بیشترین مقدار گلوکز خون در تیمار دو (۰/۱ گرم پربیوتیک) و کمترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده شد. بعلاوه بیشترین مقدار تری گلیسرید در بچه ماهی های آزاد تغذیه شده با ۰/۱ گرم پربیوتیک و کمترین مقدار در تیمارهای شاهد و پنج (۰/۴ گرم پروبیوتیک) مشاهده شد($P\leq0.05$) .

**جدول ۱: تغییرات میزان THC در میگوهای آلوده در مقایسه با میگوهای کنترل در زمانهای مورد آزمایش**

| پارامتر | شاهد | ۰/۱ گرم پروبیوتیک | ۰/۲ گرم پروبیوتیک | ۰/۳ گرم پروبیوتیک | ۰/۴ گرم پروبیوتیک |
|---|---|---|---|---|---|
| وزن اولیه (گرم) | ۶/۹۶±۰/۱۷ | ۶/۸۸±۰/۰۵ | ۷±۰/۲۴ | ۶/۹۴±۰/۰۹ | ۷/۰۱±۰/۰۶ |
| وزن نهایی (گرم) | ۱۶/۵۴±۰/۴۳$^{b}$ | ۱۵/۵۵±۱$^{b}$ | ۱۸/۸۳±۰/۵۱$^{a}$ | ۱۷˙/۱۴±۰/۹$^{b}$ | ۱۶/۸۹±۰/۹$^{b}$ |
| افزایش وزن (درصد) | ۱۳۷/۶۱±۶/۹۴ $^{bc}$ | ۱۳۱/۵۶±۷/۱$^{c}$ | ۱۶۹/۰۳±۵/۵۳$^{a}$ | ۱۴۶/۸۹±۶/۹۱$^{b}$ | ۱۴۰/۷۰±۹/۴۶ $^{bc}$ |
| ضریب ویژه رشد درصد) | ۱/۸۰±۰/۰۳$^{b}$ | ۱/۷۴۹±۰/۱۱$^{b}$ | ۲/۶۰۱±۰/۰۶$^{a}$ | ۱/۸۸۲±۰/۰۹$^{b}$ | ۱/۸۳±۰/۱۰$^{b}$ |
| ضریب تبدیل غذایی(درصد) | ۱/۱۳±۰/۰۲$^{a}$ | ۱/۱±۰/۰۶$^{ab}$ | ۱/۱±۰/۰۴$^{ab}$ | ۱/۱±۰/۰۱$^{ab}$ | ۱/۰۴±۰/۰۳$^{b}$ |

میانگین ها و انحراف معیار(**Mean ± SD**) با حروف متفاوت در ردیف های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دارآماری در تیمارها می باشند (۰/۰۵> **P**).



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

**جدول ۳- فاکتورهای خونی در ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با تیمارهای مختلف غذایی**

| پارامتر های خونی | شاهد | ۰/۱ گرم پروبیوتیک | ۰/۲ گرم پروبیوتیک | ۰/۳ گرم پروبیوتیک | ۰/۴ گرم پروبیوتیک |
|---|---|---|---|---|---|
| گلبول قرمز (۱۰^۶×میکرو لیتر) | $۸۵\times۱۰^{۶}\pm۳۱^{a}$ | $۶۸\times۱۰^{۶}\pm۲۰^{ab}$ | $۶۰\times۱۰^{۶}\pm۷۴^{ab}$ | $۸۰\times۱۰^{۶}\pm۲۷^{a}$ | $۵۰\times۱۰^{۶}\pm۱۲^{b}$ |
| گلبول سفید (۱۰^۳×میکرو لیتر) | $۶\times۱۰^{۳}\pm۲۹^{c}$ | $۸\times۱۰^{۳}\pm۳۲^{bc}$ | $۱۷\times۱۰^{۳}\pm۱۵۰^{a}$ | $۱۳\times۱۰^{۳}\pm۷۲^{ab}$ | $۵\times۱۰^{۳}\pm۱۴^{c}$ |
| هموگلوبین(گرم در دسی لیتر) | ۵/۵۹۹±۰/۵۹۲ | ۵/۵۰۱±۰/۵۳۴ | ۴/۹۳۷±۱/۱۸۹ | ۶/۴۴۹±۰/۵۸ | ۵/۳۲۹ |
| هماتوکریت (درصد) | ۳۸/۵±۱/۲۹ | ۴۰/۶±۳/۵ | ۳۷/۷۵±۲/۶۲۹ | ۳۴/۵±۰/۷ | ۳۹/۶۶±۲/۸۸ |
| MCV (فمتو لیتر) | $^{c}۴۴۸/۹۷\pm۱۵/۰۵$ | $^{b}۵۹۲/۰۸\pm۸/۹۶$ | $^{b}۶۲۹/۱۶\pm۸/۹۶$ | $^{c}۴۲۸/۵۷\pm۸/۷۸$ | $^{a}۷۹۳/۳۳\pm۵۷/۷۳$ |
| MCH (پیکو گرم) | $^{c}۶۵/۳۰\pm۶/۹۱۱$ | $^{b}۸۰/۲۳\pm۷/۷۹$ | $^{b}۸۲/۲۸\pm۱۹/۸۱$ | $^{b}۸۰/۱۱\pm۷/۲۱$ | $^{a}۱۰۶/۵۹\pm۱۸/۳۱$ |
| MCHC (درصد) | ۱۴/۴±۲/۲۳ | ۱۳/۹۲±۱/۴۶ | ۱۲/۴۳±۳/۹۸ | ۱۸/۳۲±۱/۷۳ | ۱۳/۶۴±۱/۲۹ |
| گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر) | $^{b}۳۶/۸۰\pm۶/۶۴$ | $^{a}۸۵/۳۹\pm۱۰/۹۸$ | $^{b}۴۰/۵۱\pm۱۷/۴۷$ | $^{b}۴۰/۷۱\pm۲۱/۹۶$ | $^{b}۴۴/۴۵\pm۳/۶۲$ |
| کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر) | ۱۰۷/۹۱±۱۳/۰۹ | ۱۵۰/۸۴±۴۰/۲۶ | ۱۴۲/۴۳±۲۲/۵۳ | ۱۶۱/۲۹±۴۰/۸۲ | ۱۱۱/۰۹±۲۳/۶۳ |
| تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر) | $^{c}۱۳۵/۵۶\pm۹/۳۹$ | $^{a}۳۲۱/۲۶\pm۷۱/۷۹$ | $^{ab}۲۹۰/۰۶\pm۸۲/۳۰$ | $^{ac}۱۹۱/۴۶\pm۵۱/۸۲$ | $^{c}۱۳۴/۶۳\pm۱۴/۲۵$ |
| پروتئین کل (گرم در دسی لیتر) | ۳/۶۵۹±۰/۱۸۴ | ۳/۶۸۵±۰/۱۱۴ | ۳/۶۳±۰/۱۴۳ | ۳/۷۸±۰/۱۳۴ | ۳/۹۱۹±۰/۲۰۲ |

میانگین ها و انحراف معیار(**Mean ± SD**) با حروف متفاوت در ردیف های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دارآماری در تیمارها می باشند (**P** <۰/۰۵).

## بحث

در تحقیق حاضر افزودن پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر به افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه منجر شد که این افزایش در سطح ۰/۲ گرم پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی به ازای هر کیلوگرم از غذا با تیمارهای دیگر معنی دار بود. نتایج مشابهی هم در استفاده پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی در میگو (ضیایی نژاد و همکاران، ۱۳۸۲ و خلیل پذیر و همکاران، ۱۳۷۴) گزارش شده است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی موجب افزایش پارامترهای رشد می‌شود. به طوری که جیره حاوی ۰/۲گرم پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد، وزن نهایی، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه بالاتری داشت. به نظر می‌رسد که افزایش رشد مشاهده شده در تحقیق حاضر به دلیل افزایش اشتها و ترشح آنزیم یا بهبود سلامتی ماهی در نتیجه کنترل عفونت و افزایش قابلیت هضم مواد غذایی باشد(Gatesoupe , 1999). مکانیزم عملکرد این ماده (پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی) بر مبنای افزایش تعداد باکتری‌های مفید روده، تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH روده، موجب توقف رشد پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش شده و با تحریک سیستم ایمنی آبزیان مقاومت آنها را علیه باکتریها، ویروس‌ها و سایر عوامل استرس‌زا به میزان معنی‌داری افزایش می‌دهد. دلایل این افزایش را شاید بتوان به از بین رفتن باکتری‌های دیگر بویژه باکتری‌های مضر به وسیله باکتریهای مفید (پروبیوتیک) دانست. این



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

احتمال وجود دارد که جمعیتهای میکروبی برخی مواد شیمیایی آزاد کنند که بر جمعیت‌های میکروبی دیگر آثار ضد میکروبی داشته باشند و بتوانند روابط بین جمعیتی را از طریق تحت تأثیر قرار دادن و رقابت برای جذب مواد شیمیایی یا انرژی موجود تغییر دهند (Gatesoupe., 1999). بر اساس گزارشی، باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله باکتریهایی هستند که ترکیباتی همانند باکتریوسینها را تولید می‌کنند و بدین طریق از رشد میکروارگانیسم های دیگر جلوگیری می‌کنند (Vazquez *et al.*, 2005). همانگونه که Moriarty (۱۹۹۹) نیز بیان می‌کند باکتری‌های باسیلوس هم قادرند سایر باکتری‌ها را از بین ببرند (با تولید آنتی بیوتیک ها) و هم قادرند برای مواد غذایی، فضا و سطح با سایر باکتری‌ها رقابت کنند. همچنین Rengpipat و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان دادند که پروبیوتیک Bacillus S11 قادر است هم در محیط و هم در دستگاه گوارش آبزی و هم در مدفوع جایگزین گونه‌های ویبریو شود و از این طریق بازماندگی را افزایش می‌دهد. به علاوه این مسئله (افزایش بازماندگی) ممکن است به علت افزایش سطح ایمنی آبزی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا باشد و یا اینکه این پروبیوتیک می‌تواند با فعال‌سازی دفاع ایمنی هومورال و سلولی و نیز با مکانیسم‌های حذف رقابتی در دستگاه گوارش آبزی، از آنها در برابر بیماری‌ها محافظت کند و بازماندگی را بهبود بخشد. در توجیه افزایش پاسخ‌های ایمنی بیان کرده‌اند که آنتی‌ژن‌های سطحBacillus S11 یا متابولیت‌های آن‌ها ممکن است برای دفاع ایمنی آبزیان به عنوان ژن‌های ایمنی عمل کنند. Gastesuqe (۱۹۹۹) بیان نمودند که برخی از پروبیوتیک ها موجب افزایش اشتهای میزبان می شوند و در نتیجه آن شاخص های رشد از جمله وزن نهایی بهبود پیدا می کند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان می دهد که پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی ها به طور معنی داری وزن نهایی، افزایش وزن و ضریب ویژه رشد بچه ماهی های آزاد را نسبت به ماهیان شاهد افزایش داد. Irianto و Austin در سال ۲۰۰۲ عنوان کردند که اضافه کردن پروبیوتیک ها به غذای ماهی باعث افزایش فعالیت های گوارشی، آنزیمی و تحریک اشتها و نهایتاً افزایش رشد می شوند. Merrifield (۲۰۰۹) اعلام کرد که اختلاف معنی داری در فاکتورهای رشد از جمله ضریب ویژه رشد و ضریب تبدیل غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به ماهیان شاهد داشت. نتایج مشابهی نیز در تحقیقی به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوفرین خوراکی بر پارامترهای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت زمان‌های مختلف بدست آمد، در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاربرد لاکتوباسیل پلانتاروم و لاکتوفرین در مدت ۶۰ روز، بر میزان رشد ماهیان تاثیر بهتری داشته است (عزیزی و همکاران،۱۳۹۰).

خون، به عنوان یک بافت سیال و سهل‌الوصول یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردند. لذا در اختیار داشتن مقادیر طبیعی پارامترهای خونی و بررسی چگونگی تغییرات آن‌ها در بیماری‌های مختلف همواره از ابزارهای مهم تشخیص در بسیاری از بیماری‌های آبزیان بوده است. شاخص‌های خونی در ماهیان می‌تواند متاثر از مواردی چون گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و رژیم غذایی باشد(Burt *et al.*, 2005). فرمولاسیون جیره های غذایی، نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص پروبیوتیک مصرفی، روش های مختلف اضافه کردن به جیره به طور قابل ملاحظه ای بر خصوصیات ریخت شناسی خون اثر می گذارند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر از نظر میزان هماتوکریت، MCH وMCHC بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در این تحقیق تیمار پنجم اختلاف معنی داری در تعداد گلبول های قرمز با گروه شاهد را نشان داد ولی سایر تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی داری نشان نمی دهد. احتمالاً عدم معنی داری درصد هماتوکریت در تیمارها و معنی دار بودن گلبول قرمز تیمار پنجم با گروه شاهد را در وضعیت غذایی یا بهداشتی ماهیان و در نتیجه کاهش حجم خون ماهیان توجیه کرد (ستاری، ۱۳۸۱). از



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

نظر تعداد گلبول سفید تیمارهای آزمایشی با مصرف پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی سیستم ایمنی آنها تحریک می‌شود و تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون می‌تواند موجب افزایش فاگوسیتوز گردد. به علاوه بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ۳ (۰/۲گرم) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید. از نظر تعداد گلبول قرمز با مصرف پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی تعداد گلبول‌های قرمز در همه تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان دادند ولی میزان هماتوکریت تغییری نکرد. در همین خصوص نتایج مشابهی توسط Aly و همکاران در سال ۲۰۰۸ در استفاده از پروبیوتیک در ماهی تیلاپیای نیل مشاهده کردند. از نظر میزان هموگلوبین بین تیمارهای آزمایشی ۲، ۳، ۴ و ۵ نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری وجود دارد. بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار ۴ (۰/۳گرم) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد.از نظر MCV بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معناداری مشاهده می‌شود. بیشترین میزان آن در تیمار۵ (۰/۴گرم) در مقایسه با تیمار شاهد( بدون پروبیوتیک) مشاهده می-شود. در مطالعه‌ای افزودن توأم پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی (۱۰۰میلی گرم) و پری‌بیوتیک مانان (۵ میلی گرم) توانست به طور معنی‌داری سبب بهبود رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با ماهیان گروه شاهد گردد. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق بیان شد که استفاده از ترکیبات طبیعی و ایمن به جای آنتی بیوتیک‌های محرک رشد، می‌تواند هم رشد ماهی را افزایش دهد و هم از ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی جلوگیری کند (جنایی و همکاران، ۱۳۹۰). Irianto و Austin (۲۰۰۲) گزارش کردند که تغذیه با پروبیوتیک-های گرم مثبت و گرم منفی به ازای $10^7$ سلول در هر گرم جیره سبب تحریک ایمنی سلولی می‌شود اما بر ایمنی هومورال (سرم و افزایش فعالیت لیزوزوم مشاهده شد. همچنین در مطالعه‌ای اثر پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی بر پارامترهای خونی فیل ماهی جوان پرورشی که توسط حمیدیان و همکاران۱۳۹۲ انجام شد به این نتیجه رسیدند که سطوح مختلف پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی تاثیری بر پارامترهای خونی ندارد، حمیدیان و همکاران نشان دادند که با افزایش میزان پروبیوتیک تعداد گلبول‌های قرمزو گلبول‌های سفید افزایش می‌یابد، آنتی بادی‌های مخاط) تاثیری ندارد. در این مطالعه با افزودن پروبیوتیک به جیره بعد از ۲ هفته افزایش قابل توجهی در تعداد اریتروسیت‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، با این حال این روند افزایش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. سهندی و همکاران (۱۳۹۲) به مطالعه تاثیر استفاده از دو گونه باکتری پروبیوتیکی *Bifidobacterium animalis* و*Bifidobacterium lactic* بر پارامترهای خونی در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که مقدار هموگلوبین، MCV، MCH، بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، اما مقدار هماتوکریت، گلبول‌های قرمز، سفید و MCHC اختلاف معنی‌داری وجود دارد. Aly و همکاران (۲۰۰۸) افزایش مقدار هماتوکریت و گلبول‌های سفید را با تغذیه پروبیوتیک پروتکسین گزارش نمودند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تحریک گلبول‌های سفید در ماهیان و صدف‌ها سبب بالا رفتن تولید آنتی‌بادی می‌شود(Gatesoupe , 1999). اگرچه سطح کلسترول و پروتئین کل سرم در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نشان نداد، سطح گلوکز و تری گلیسرید سرم به طور معنی داری در تیمار ۰/۱گرم پروبیوتیک افزایش یافت. براساس یافته های بدست آمده می توان نتیجه گرفت که افزودن ۰/۲ گرم پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی در جیره غذایی ماهیان آزاد می تواند سبب بهبود شاخص های رشد و تغییر در پارامترهای کیفی خون گردد. همچنین مطالعات بیشتری می بایست به منظور تعیین اثرات پروبیوتیک پدیوکوکوس اسید ی لاکتیسی بر فیزیولوژی دستگاه گوارش و آنزیم‌های گوارشی از جمله آمیلاز، پروتئاز و لیپاز صورت پذیرد.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

# منابع


**جنایی، ر.؛ مشکینی، س.؛ توکمه چی، ا. و جلیلی، ر.، ۱۳۹۰.** افزایش رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از پروبیوتیک باسیلوس اسید ی لاکتیسی و پری بیوتیک مانان. همایش ملی آبزی پروری ایران، صفحات ۵۸ تا ۶۴.

**حمیدیان، ن.، ۱۳۹۲.** ارزیابی اثر *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فیل ماهی (*Huso huso*). همایش ملی علوم جانوران آبزی، رشت، دانشگاه گیلان، صفحات ۲۳۱ تا ۲۴۵.

**خلیل پذیر، م.، ۱۳۷۴.** بررسی اثر پودر پروبیوتیک باسیلوس (*Bacillus* sp.) حل شده در آب، بر رشد و درصد بازماندگی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) همایش ملی جانوران آبزی، صفحات ۶۵ تا ۷۲.

**ستاری، م.، ۱۳۸۱.** کتاب ماهی شناسی (۱) ( تشر یح و فیزیولوزی ). انتشارات نقش مهر دانشگاه گیلان. صفحات ۱۰۵ تا ۱۷۶.

**سهندی، ج.، ۱۳۹۲.** ارزیابی تاثیر لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی (*Bifidobacterium animalis* و *Bifidobacterium lactic*) بر عملکرد رشد لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان( *Oncorhynchus mykiss*) در برابر استرس‌های محیطی، همایش ملی علوم جانوران آبزی، رشت، دانشگاه گیلان، صفحات ۲۳ تا۳۱.

**ضیایی نژاد، س.، ۱۳۸۲.** بررسی تاثیر باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیم‌های گوارشی در مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی (*Fenneropeaneus indicus*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. صفحات ۵۴ تا ۷۸.

**عزیزی، ح.، ۱۳۹۰.** بررسی اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوفرین خوراکی بر پارامترهای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان‌های مختلف. همایش علمی آبزی‌پروری، صفحات ۷۸ تا۸۳.

**فرزانفر، ع.؛ لشتو آقایی، غ.؛ علیزاده، م.؛ بیاتی، م. و قربانی نصرآبادی، ر.، ۱۳۸۵.** بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک جیره غذایی بر عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان( *Oncorhynchus mykiss*). گزارش نهایی طرح تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۶۶ تا ۷۱.

**محمدی آذرم، ح.؛ عابدیان کناری، ع. و ابطحی، ب.، ۱۳۸۳.** تاثیر پروبیوتیک پروتکسین بر رشد و زنده-مانی لاروماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم دریایی ایران، دوره سوم، شماره‌ی دوم و سوم، صفحات ۶۹-۷۷.

**Aly S.M., Abdel-Galil A.Y., Ghareeb A., and Mohamed M.F., 2008.** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential *probiotics*, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunology, 25: 128-136.

**Brunt J., and Austin B., 2005.** Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococosis in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Disease, 28: 693-70.

**Fuller R., 1989.** Probiotics in man and animal. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.




[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

**Gatesoupe F.J., 1991.** Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. *In*: de Pauw N (Ed.) Aquaculture -a biotechnology.

**Gatesoupe F.J., 1999.** Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture,180: 147-165.

**Irianto A., and Austine B., 2002**. Probiotics in aquaculture. Fish Disease, 25: 633-642.

**Jobron A., Olsson J.C., Westerdahl A., Conwey P.L., and Kejelleberg S., 1997.** Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances intestinal mucus and fecal exacts by *Carnobacterium* sp. strain K1. Journal of Fish Diseases, 20: 383-392.

.**Kennedy S.B., Tucker J.W., Thoresen M., and Sennett D.G., 1998.** Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae. Aquaculture 98. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 286 P.

**Merrififld D., Bardley G., Baker R., and Davies S., 2009.** Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. Aquaculture Nutrition, 22: 141-150.

**Mohanty S.N., Swain S.K., and Tripathi S.D., 1996.** Rearing of catle *(Catlacatla ham*.) Spawn on formulated diets. Journal of Aquaculture in the Tropics, 11: 253-258.

**Moriarty D.J., 1999.** Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *In*: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (Eds) Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada, pp: 1-7.

**Moriarty D.J., Decamp O., and Lavens P., 2005.** Probiotics in aquaculture. Aquaculture Asia pacific Magazine, pp: 14-16.

**Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., and Menasaveta P., 2000.** Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-288.

**Vazquez J.A., Gonzalez M.P., and Murado, 2005.** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245: 149-161.

**Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. and Van Hulten. M. C. W. 2004**. "Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination." J. Virol. 78, 2057-2061.

**Yasuda K., and Taga N., 1980.** A mass culture method for *Artemia salina* using



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

bacteria as food,. La mer (Bulletin de Ia Societe franco-japonaise d oceanographie) 18: 55-62.

[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]

# The effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth performance, blood and some serum parameters in Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*)

Hosseini A.*; Oraji H.; Yegane S.; Shahabi H.

hamedmhesh@yahoo.com
Animal Science and Fisheries Group, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Sari University,
P.O.Box: 578 Sari, Iran

**Key words**: *Pediococcus acidilactici*, Parameters of blood, Growth, Caspian salmon

## Abstract

The effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth performance, blood and some serum parameters on Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*) was studied. An experiment was designed with five treatments each with three replicates. Two hundred and seventy Caspian salmons average (±SD) initial weight of 6.9 ± 0.1 g were assigned to fifteen experimental tanks. The experimental period was eight weeks. At the end of this period, the growth parameters were measured. In addition, after 8 weeks feeding on experimental diets, hematological parameters and metabolic products (cholesterol, glucose and total protein) were measured. Results showed that feed conversion in five treatments (0.4 g probiotic) significantly was lower than control group. Specific growth rate, final weight and weight gain in treatments (0.2 g) compared with the control group significantly increased. Use of probiotics in the diet, showed no significant differences in hemoglobin, hematocrit and mean cell hemoglobin concentration (MCHC). The mean cellular hemoglobin concentration (MCH) and mean corpuscular volume (MCV) were significantly increased in five treatments (0.4 g) compared with the control group, but significantly decreased red blood cell counts (RBC) in five treatments. White blood cells also increased the amount of probiotics 0.2 g. The results of this study indicated that 0.2 g/kg *Pediococcus acidilactici* probiotics in the diet could be a useful food supplement and should be used to improve the growth parameters in Caspian salmon.

*Corresponding author



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-17 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.2.3.1 ]
[ DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 ]