اثر ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر شاخص‌های رشد، تغذیه و فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **مریم احمدمرادی***: بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **سیاوش سلطانیان**: بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **مجتبی علیشاهی**: بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مصطفی اخلاقی**: بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **علی شهریاری**: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **آزاده یکتاسرشت**: بخش پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور مقایسه تأثیر باکتری *Lactobasillos plantarum* ریزپوشانی شده (با ریز ذرات کیتوزان/ آلژینات) و معمولی (بدون ریزپوشانی) بر شاخص‌های رشد، تغذیه و فاکتورهای خونی در ماهی قزل آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* انجام شد. ۴۸۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۱۵±۱/۲ در چهار گروه (با سه تکرار) به‌مدت ۸ هفته به‌ترتیب با جیره‌های آزمایشی شامل: لاکتوباسیلوس پلانتاروم بدون ریزپوشانی (تیمار۱)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با کیتوزان و آلژینات (تیمار۲)، کیتوزان و آلژینات بدون باکتری (تیمار۳) و فقط خوارک پایه (گروه شاهد) تغذیه شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین ضریب رشد ویژه و فاکتور وضعیت، مربوط به تیمار۲ بود، البته ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین نیز در تیمار۲ و۳ نسبت به گروه شاهد بهبود نشان داد، هرچند این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. هم‌چنین بیش‌ترین میزان هماتوکریت، هموگلوبین و حجم متوسط گلبول قرمز در تیمار ۲ مشاهده شد که هماتوکریت با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). بیش‌ترین تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و کم‌ترین مقدار غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی در تیمار۱ مشاهده شد. تعداد گلبول‌های سفید نیز در تیمار ۳ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. بنابراین می‌توان بیان کرد به‌کارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم موجب بهبود شاخص‌های رشد، تغذیه و فاکتورهای خونی شد ولی برای توصیه این روش جهت تجویز پروبیوتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی بیش‌تری لازم است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، تغذیه، *لاکتوباسیوس پلانتاروم*، ترکیبات خونی، نانوذرات، ریزپوشانی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.ahmadmoradi2015@gmail.com

مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی می‌تواند منجر به ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم، انباشتگی ترکیبات مضر در محیط و بافت ماهی و مشکلات زیست محیطی گردد (Irianto و Austin،۲۰۰۲)، بنابراین در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره ماهی به منظور افزایش کارایی غذایی، برقراری تعادل میکروبی روده و افزایش سلامتی و میزان بازماندگی آن‌ها رو به‌فزونی بوده است (Dimitroglou و همکاران، ۲۰۱۱؛ Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۳). بسیاری از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله لاکتوباسیل‌های موجود در روده ماهیان سالم قادر به تولید ترکیبات بازدارنده مانند باکتریوسین‌های پپتیدی ضدقارچ، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی هستند که برضد پاتوژن‌ها عمل می‌کنند (Haghi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Vine و همکاران، ۲۰۰۶). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک باکتری پروبیوتیک، گرم‌مثبت، میله‌ای، غیراسپورزا، غیرمتحرک و تولیدکننده اسیدلاکتیک بوده که می‌تواند در محدوده دمایی ۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد رشد کند (Iyer و همکاران، ۲۰۰۸). یکی از جدیدترین روش‌ها برای افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها به‌کارگیری فن‌آوری ریزپوشانی است که توسط آن پروبیوتیک‌ها توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوییدی پوشش‌دار می‌شوند که در نتیجه پروبیوتیک‌ها از شرایط نامساعد محیطی تا زمان رسیدن به روده دور نگه داشته می‌شوند. ریزپوشانی در مورد پروبیوتیک‌ها هم‌چنین می‌تواند باعث افزایش پایداری و بهبود خصوصیات حسی، توزیع متوازن پروبیوتیک‌ها در محل جایگزینی، به‌علت عدم تحرک سلول‌ها شود. آلژینات سدیم به‌دلیل غیرسمی بودن، داشتن توانایی تطابق زیستی، کم هزینه بودن و سهولت تهیه آن جهت ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها ترجیح داده می‌شود (Mortazavian و همکاران، ۲۰۰۷؛ Tuohy و همکاران، ۲۰۰۹). اما به‌علت حساس بودن آلژینات به شرایط اسیدی و ناپایداری آن در برابر اسیدلاکتیک، از مخلوط آلژینات با سایر ترکیبات پلیمری استفاده می‌گردد. کیتوزان یک پلی‌ساکارید خطی با بار منفی ناشی از گروه‌های آمینی است و می‌تواند به‌وسیله تشکیل ارتباط متقاطع در حضور آنیون‌ها پلیمریزه شود. در حقیقت ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک با پوشش آلژینات و کیتوزان برای باکتری‌ها محافظت در برابر شرایط نامساعد گوارشی را فراهم و می‌تواند روش خوبی برای تحویل باکتری‌های زنده به روده باشد (Mortazavian و همکاران، ۲۰۰۷). اختلاط آلژینات کلسیم با نشاسته ذرت یا نشاسته مقاوم به‌عنوان ترکیب پری‌بیوتیک نسبت به آلژینات کلسیم به تنهایی، هم انسجام و یک‌پارچگی ریزپوشانی و هم قابلیت بقا را بهبود می‌دهد (Sultana و همکاران، ۲۰۰۰). Naseri و همکاران (۲۰۰۸) نیز نتایج مثبتی در استفاده از پروبیوتیک BioPlus2B در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دست یافت. بهبود شاخص‌های رشد در تیمارهای پروبیوتیکی را می‌توان در برخی تحقیقات دیگر نیز مشاهده کرد (Gatesoupe و همکاران، ۱۹۹۹؛ Aubin و همکاران، ۲۰۰۵). براساس نتایج بسیار ارزشمندی که در مطالعات متعدد به‌دست آمده است، این گونه نتیجه‌گیری می‌شود که ریزپوشانی نقش بسیار مهمی در حفاظت این ارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی ایفا می‌کند و درنتیجه میزان بقای این ارگانیسم‌ها را در محیط‌هایی ازجمله مایع معده‌ای روده‌ای بهبود می‌بخشد (Ohashi و همکاران، ۲۰۰۴). علی‌رغم اثبات اثر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها در روند پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان، تاکنون از روش‌های افزایش کارایی تاثیر پروبیوتیک‌هایی ازجمله روش‌های ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در این گونه ماهی تحقیقی صورت نگرفته است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثر پروبیوتیک ریزپوشانی شده و معمولی بر عملکرد رشد و فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد تا بتوان گامی در راستای افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل و بهبود فلور باکتریایی روده با استفاده از پروبیوتیک بومی و به تبع آن کاهش هزینه‌های پرورش این ماهی ارزشمند برداشت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پروبیوتیک: در این تحقیق باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده توسط محمدیان و همکاران (۱۳۹۴) از بین بیش از ۳۰ گونه باکتری اسیدلاکتیک در روده ماهی شیربت (Tor grypus) با بیش‌ترین توان پروبیوتیکی در شرایط برون تنی (*In vitro*) و درون تنی (*In vivo*) انتخاب شد. باکتری‌ها در محیط کشت MRS براث در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و پس از رشد، با دور ۱۵۰۰rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در سرم فیزیولوژی استریل به‌صورت سوسپانسیون و به‌کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها براساس ۸ مک فارلند، $2/4 \times 10^9$ CFU در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. نهایتاً غلظت پروبیوتیک در خوراک به‌میزان 10^8 CFU به‌ازای هر گرم خوارک درنظر گرفته شد. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گرفت. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری گردید (Planas و همکاران، ۲۰۰۴؛ Vine و همکاران، ۲۰۰۶).

ریزپوشانی پروبیوتیک با ریزذرات آلژینات و کیتوزان: به منظور ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی از روش امولسیون داخلی (Internal Emulsification) استفاده شد. ابتدا در یک بشر به محلول آلژینات سدیم، سوسپانسیون کربنات کلسیم به‌آرامی اضافه و پس از آن محلول حاصل با سوسپانسیون باکتری ($2/10^9 \pm 4$) به‌آرامی مخلوط گردید. در بشر دیگر روغن زیتون صنعتی را با ۱/۵درصد

Span۸۰ اضافه کرده، سپس محتویات بشر اول و بشر دوم را به‌مدت ۱۵ دقیقه با هم‌زن برقی مخلوط شد. در ظرف سوم روغن زیتون با ۵ درصد اسیداستیک مخلوط و قطره قطره به محلول فوق اضافه شد تا pH به ۳/۵ برسد. با اضافه نمودن بافر فسفات و سانتریفوژ محصول، روغن از محلول جدا شد. در مرحله بعد به‌میزان ۱۵ سی‌سی محلول کیتوزان ۰/۴ درصد، قطره قطره به محلول اضافه و به‌مدت یک ساعت کاملاً هم‌زده شد. نهایتاً محلول به‌دست آمده با سرعت ۴۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Huiyi و همکاران، ۲۰۱۳).

بررسی مشخصات محصول ریزپوشانی شده: ویژگی‌های محصول ریزپوشانی شده شامل: اندازه ذرات (با استفاده از دستگاه پارتیکل سایزر)، شکل و نحوه پراکنش ذرات با میکروسکوپ فاز کنتراست مشخص گردید. ۱ گرم از نمونه‌های ریزپوشانی شده در ۹۹ میلی‌گرم محلول ۱درصد (وزنی/حجمی) سدیم سیترات استریل در pH حدود ۶ پراکنده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده تا باکتری‌ها آزاد شوند. آن‌گاه با استفاده از محیط کشت MRS در شرایط جار بی‌هوازی، دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شده و تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. این شمارش در سه تکرار صورت گرفت (رضایی‌مکرم و همکاران، ۱۳۸۹). اندازه کپسول‌های پراکنده در آب یون زدایی شده و فراوانی هر یک از آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قطر ذرات (Particle Sizer) براساس میانگین مجذور قطر ذرات (d_{peak} (VMD) و هم‌چنین $d_{۱۰}$، $d_{۵۰}$ و $d_{۹۰}$ گزارش شد (جدول۲).

طراحی آزمایش: در این تحقیق به‌منظور مقایسه توان پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشانی شده و معمولی ۴۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱/۲±۱۵ گرم تهیه و به آزمایشگاه بخش آبزیان بیمارستان دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. ماهی‌ها به‌مدت دو هفته در شرایط استاندارد برای سازش‌پذیری با شرایط تحقیق نگه‌داری و با جیره تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان دو بار در روز و به‌میزان توصیه شده توسط کارخانه (براساس وزن ماهی و دمای آب) تغذیه شدند. این تحقیق شامل ۴ تیمار (هر یک در ۳ تکرار) به‌شرح زیر بود:

تیمار اول: ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بدون ریزپوشانی، تیمار دوم: ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشانی شده با کیتوزان و آلژینات، تیمار سوم: ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی کیتوزان و آلژینات بدون باکتری، تیمار چهارم: تغذیه شده با خوارک پایه

ماهی‌ها به‌مدت ۸ هفته با خوراک مشخص شده برای هر گروه تغذیه شدند. غلظت پروبیوتیک در تیمارهای اول و دوم به‌میزان $۱۰^{۸}$CFU به‌ازای هر گرم خوراک و نحوه اضافه نمودن پروبیوتیک طبق روش‌های رایج انجام شد. به‌طورخلاصه یک کیلو خوراک روی یک سینی استریل فلزی پخش‌شده و میزان محاسبه‌شده پروبیوتیک (معمولی و ریزپوشانی شده) روی خوراک اسپری گردید. خوراک‌ها بعد از خشک شدن تا زمان مصرف در فریزر نگه‌داری گردیدند. نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر و انتهای هفته هشتم صورت گرفت.

بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه: در ابتدای دوره پرورش و انتهای هفته هشتم زیست‌سنجی تیمارها صورت گرفت. میزان خوراک مصرفی براساس دمای آب و وزن بدن تنظیم و مصرف خوراک روزانه ثبت گردید و با استفاده از فرمول‌های استاندارد زیر شاخص‌های رشد بررسی شدند.

میزان رشد ویژه (SGR= Specific growth rate):

$$\%SGR = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t_2 - t_1} \times ۱۰۰$$

W_f:وزن نهایی (گرم)، W_i:وزن اولیه (گرم)، (t_2-t_1): تعداد روزهای آزمایش

ضریب تبدیل غذایی (FCR= Feed Conversion ratio):

$$FCR = \frac{F}{W_f - W_i}$$

FCR: ضریب تبدیل غذایی، F: غذای مصرفی (وزن خشک به گرم)

میزان کارآیی پروتئین (PER= Protein efficiency ratio):

$$PER = \frac{BW_f - BW_i}{AP}$$

BW_f: وزن نهایی (گرم)، BW_i: وزن اولیه (گرم)، AP: پروتئین مصرفی

میزان رشد روزانه (BWG= Body Weight Growth):

$$\%BWG = BW_f - BW_i / BW_i \times ۱۰۰$$

BWG٪:درصدافزایش وزن بدن، BW_f:وزن نهایی(گرم)، BW_i:وزن اولیه(گرم)

فاکتور وضعیت (CF= Condition Factor): $CF=(W/L^3)\times ۱۰۰$

CF:شاخص کیفیت، W:وزن ماهی (وزن تر به گرم)، L: طول ماهی(سانتی‌متر)

سنجش فراسنجه‌های خون شناسی: در این مطالعه از هر تکرار ۳ قطعه ماهی در ابتدای دوره پرورش و ۳ قطعه ماهی در انتهای هفته‌هشتم از ساقه‌دمی توسط سرنگ ۲ میلی لیتری هپارینه خونگیری به‌عمل آمد. پارامترهای خونی شامل تعداد گلبول های قرمز (RBC= Red Blood Cells)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC= White Blood Cells) (Thrall، ۲۰۰۴)، میزان هموگلوبین (Hb= Hemoglobin)، میزان هماتوکریت(Hct=Hematocrit)(Feldman و همکاران، ۲۰۰۰)، هم‌چنین حجم متوسط گلبول قرمز (MCV= Mean Corpuscular Volume)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH= Mean Corpuscular Hemoglobin) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC= Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) موردبررسی قرار گرفتند(Henry، ۱۹۹۶).تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش

۲۰ انجام شد. برای بررسی معنی‌داری بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته و هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

شمارش تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده و تعیین اندازه ذرات و نحوه پراکنش آن‌ها: تعداد اولیه باکتری‌های زنده قبل از ریزپوشانی $۲/۴ \times ۱۰^{۹}$ CFU در هر میلی‌لیتر و تعداد باکتری‌های به دام‌افتاده در کپسول‌ها $۲/۰۲ \pm ۰/۰۶ \times ۱۰^{۹}$CFU در هر میلی‌لیتر محاسبه شد. مشاهده با روش SEM نشان داد که ریزپوشینه‌ها از نظر شکل ظاهری تا حدود زیادی به شکل کروی و بیضوی هستند. اندازه ذرات ریزپوشانی شده و نمودار توزیع آن‌ها به‌ترتیب در جدول۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج مربوط به آنالیز اندازه ذرات محصول *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ریزپوشانی شده

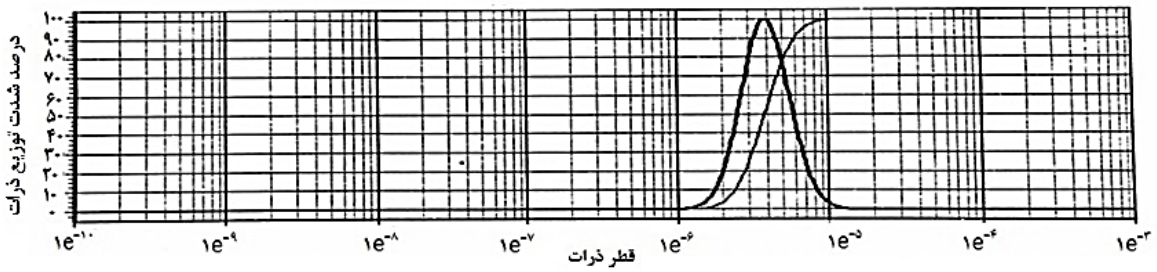
نوع نانوذرات	Span* ± میانگین	$d_{(۱۰)}$**	$d_{(۵۰)}$***	$d_{(۹۰)}$****
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳/۸۴	۲/۴۲	۳/۸۷	۶/۰۹

* Span نحوه انتشار اندازه ذرات را نشان می‌دهد و حاصل $(d_{۹۰}-d_{۱۰})/d_{۵۰}$ می‌باشد و نقش انحراف معیار (STED) در محاسبات آماری را داراست.

** قطر متوسط دهک اول ذرات (۱۰درصد ذرات با کوچک‌ترین قطر)

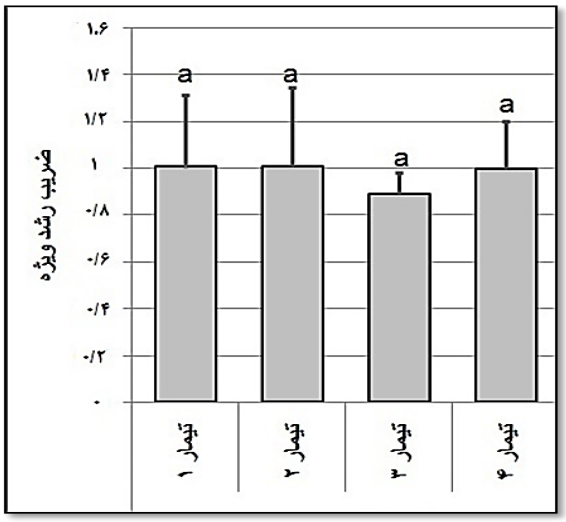
*** قطر متوسط نیمی از ذرات (۵۰ درصد ذرات با قطر کوچک‌تر)

**** قطر متوسط نه دهک اول ذرات (۹۰درصد ذرات)

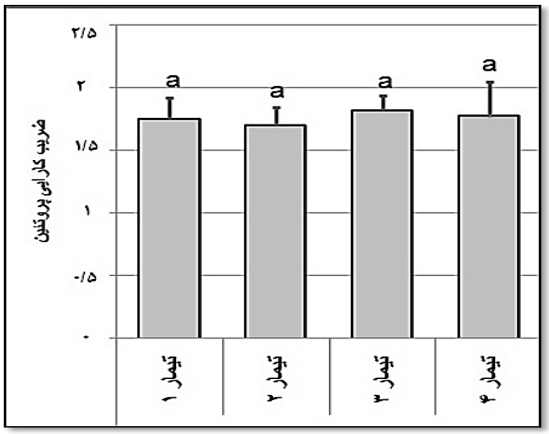


شکل ۱: نمودار نحوه پراکنش اندازه ذرات ریزپوشانی و درصد شدت توزیع آن‌ها براساس داده‌های دستگاه پارتیکل سایزر

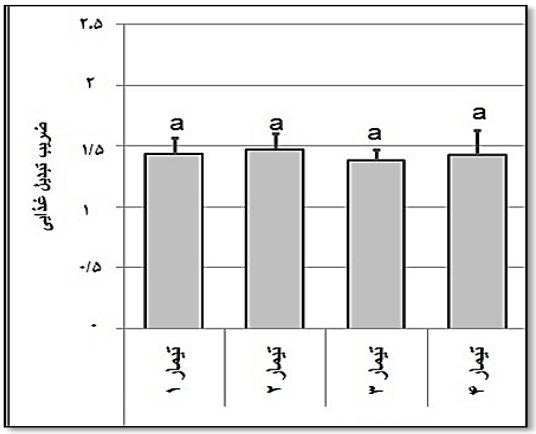
شاخص‌های رشد و تغذیه: پس از ۸ هفته غذادهی، گروه‌های آزمایشی برای اندازه‌گیری شاخص‌های رشد زیست‌سنجی شدند. نتایج نشان داد که فاکتور SGR در تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به تیمارهای دیگر بالاترین میزان را داشته است و از بین دو تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک تیمار۲ بیش‌ترین میزان SGR را دارا بوده است اما اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (شکل۲). میزان کارایی پروتیئن تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد کم‌تر بود ولی اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بین آن‌ها حاصل نشد (شکل۳). نتایج مربوط به BWG نشان داد که تیمار ۳ و تیمار ۱ به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین میزان افزایش‌وزن بدن را داشته، درحالی‌که تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) نبوده است (شکل۴). در فاکتور FCR نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). بیش‌ترین و کم‌ترین میزان FCR به‌ترتیب مربوط به گروه شاهد و تیمار ۲ بوده است (شکل۵). فاکتور وضعیت اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای تحت‌آزمایش از خود نشان نداد($P<۰/۰۵$)، هرچند که تیمار ۲ نسبت به سایر تیمارها کم‌ترین CF را نشان داد (شکل۶).



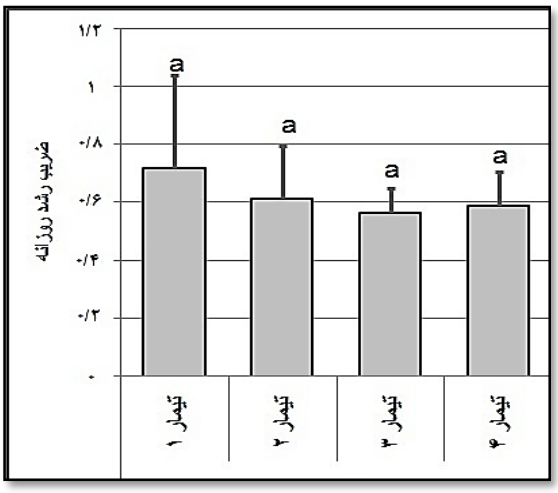
شکل۲: نمودار میانگین میزان ضریب رشد ویژه (SGR) تیمارها در انتهای دوره آزمایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان



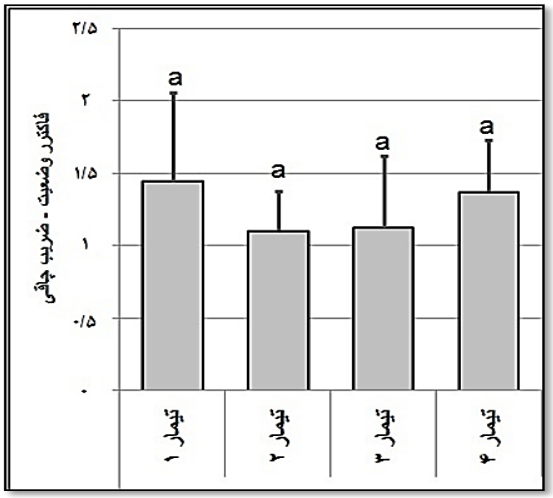
شکل۳: نمودار میانگین ضریب کارایی پروتئین (PER) تیمارها در انتهای دوره آزمایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان



شکل۵: نمودار میانگین ضریب تبدیل غذایی(FCR) تیمارها در انتهای دوره آزمایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان



شکل۴: نمودار میانگین درصد افزایش وزن بدن(BWG) تیمارها در انتهای دوره آزمایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان



شکل۶: نمودار میانگین فاکتور وضعیت (CF) تیمارها در انتهای دوره آزمایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

بیش‌ترین مقدار شاخص MCHC در گروهی که پروبیوتیک معمولی را دریافت کرده بود (تیمار۱)، مشاهده شد و کم‌ترین مقدار آن در گروهی که حاوی کیتوزان و آلرژینات بدون پروبیوتیک بود (تیمار۳)، مشاهده شد (جدول۲). در تعداد گلبول‌های سفید خون نیز بین تیمار ۳ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت، اما سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشته‌اند به‌طوری‌که افزایش تعداد WBC در تیمار۳ مشاهده شد (جدول۲).

جدول۲: نتایج فراسنجه های خونی تیمارهای در انتهای دوره آزمایشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

پارامتر	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	شاهد
RBC (×۱۰^{۶}/ میکرولیتر)	۲/۴۷±۲/۱۴^{a}	۱/۲۵±۰/۳۷^{a}	۱/۷۱±۰/۵۷^{a}	۱/۲۲±۰/۳۵^{a}
Hb (گرم/ دسی‌لیتر)	۴/۱۱±۲/۱۳^{a}	۴/۸۶±۱/۰۷^{a}	۳±۱/۷۴^{a}	۳/۹۵±۰/۵۰^{a}
Htc (درصد)	۳۸/۵±۴/۸۴^{a}	۳۹/۳۳±۳/۳۹^{a}	۳۴/۳۳±۱۰/۹۶^{ab}	۳۲±۳/۶۳^{b}
MCV (فمتولیتر)	۲۴۹/۱۹±۱۴۳/۴۹^{a}	۳۲۹/۲۷±۷۶/۹۳^{a}	۲۳۵/۴۵±۴۳/۳۹^{a}	۲۷۷/۴۶±۸۲/۷۳^{a}
MCH (پیکوگرم)	۲۸/۵۹±۱۹/۱۴^{a}	۴۲/۴۷±۱۶/۳۶^{a}	۲۹/۴۳±۱۹/۸۳^{a}	۳۳/۶۰±۶/۱۹^{a}
MCHC (گرم/ دسی‌لیتر)	۱۳/۸۷±۷/۸۰^{a}	۱۲/۶۰±۳/۳۴^{a}	۱۲/۶۳±۹/۴۱^{a}	۱۲/۵۱±۲/۲۰^{a}
WBC (۱۰^{۳}/میکرولیتر)	۳۸±۵/۸۸^{ab}	۶۴/۸±۳۴/۴۲^{a}	۴۰/۲۵±۵/۳۷^{ab}	۲۶/۲۵±۳/۸۶^{b}

حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد آزمایش می‌باشد (p<۰/۰۵)

بحث

از آن‌جاکه میکروارگانیسم‌های نامناسب اثرات ناخواسته‌ای را در میزبان به‌جا می‌گذارند، انتخاب پروبیوتیک مناسب بسیار ضروری است. در تحقیق حاضر برای نخستین بار نشان داده شد که افزودن پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده باکیتوزان و آلژینات به‌جیره‌غذایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به بهبود عملکرد رشد منجر شد. بیش‌تر پروبیوتیک‌هایی که تاکنون به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک در آبزی‌پروری معرفی شده‌اند به باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند Cornobacterium و Lactobacillus، Bacillusوجنس *Pesudomonas* تعلق دارند (Verschuereو همکاران، ۱۹۹۹). Bagheri و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که پروبیوتیک‌های تجاری *Bacillus subtilis* و *Baciliius licheniformis* قادر به بهبود درصد بقا، ضریب رشد ویژه، فاکتور وضعیت و افزایش تعداد باسیلوس‌های دستگاه گوارش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشند. با مقایسه نتایج در پایان دوره آزمایش بین تیمارها، تیمار ۲ بهترین ضریب رشد ویژه را نشان داد، به‌طوری‌که باکتری‌های‌موجوددر میکروکپسول‌ها موفق به رقابت با میکروفلورهای موجود در روده شده و منجر به تشکیل کلنی مؤثری شده بودند. در نتیجه تأثیر پروبیوتیک بر سنتز ویتامین‌ها، کوفاکتورها و افزایش فعالیت آنزیمی بیش‌تر شده است(Fuller، ۱۹۸۹)که این امر در نهایت منجر به بهبود شاخص‌های رشد در بچه‌ماهیانی که از جیره غذایی حاوی باکتری تغذیه شدند، گردید. نتایج مشابهی برای ماهی فلاندر ژاپنی *Paralichthys oliraceus*به‌دست‌آمد(Taokaوهمکاران،۲۰۰۶). براساس تحقیق انجام شده توسط Ogino وSaito (۱۹۷۰) بر روی کپورماهیان، کم‌ترین میزان رشد مربوط به ماهیان با میزان بازده پروتئین بالاتر بوده‌که با نتایج مطالعه اخیرهم‌سو می‌باشد، به‌طوری‌که گروه شاهد بالاترین میزان PER را داشته ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین ملاحظه شد که وزن بدن ماهیانی که از جیره غذایی که فقط حاوی پروبیوتیک بودند (تیمار۱) در انتهای دوره‌آزمایش‌نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت که با مطالعه حسینی و همکاران (۱۳۹۵) مطابقت دارد. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که استفاده از جیره غذایی حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان و آلژینات و هم‌چنین جیره غذایی حاوی نانوذرات کیتوزان و آلژینات به تنهایی (فاقد پروبیوتیک) تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد فیل‌ماهی جوان نداشت. Jafaryan و همکاران (۲۰۰۹) عنوان کردند که به‌کارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیکی تجاری در جیره‌های آزمایشی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد. این باکتری‌ها دارای آنزیم‌های خارج سلولی بوده و از طریق‌فعالیت‌های‌آمیلولیتیک،سلولولیتیک، پروتئولیتیک و لیپولیتیک خارج سلولی و تخمیر مواد غذایی، کارای مصرف (اتولیز) غذا را افزایش داده و ضریب تبدیل غذایی را کاهش می‌دهند (Ghosh و همکاران، ۲۰۰۳).هم‌چنین در مطالعه دیگری ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی باکتری *L. lactis* نسبت به شاهد بر روی تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* بهبود معنی‌داری داشته است (Shenavar Masouleh و همکاران، ۲۰۱۳) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. ضریب تبدیل غذایی که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تغذیه‌ای است، با به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در تیمارهای ۱ و۲ در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. لازم به ذکر است که افزایش ضریب تبدیل غذایی تیمار۳ (ریزپوشانی بدون پروبیوتیک) نسبت به گروه شاهد در پایان دوره آزمایش می‌تواند تأییدی بر تأثیر کیتوزان بر کاهش جذب چربی‌ها در دستگاه گوارش ماهیان مورد مطالعه در این تحقیق باشد. به‌عبارت دیگر کیتوزان با کاهش جذب چربی‌ها باعث افزایش شاخص ضریب تبدیل غذایی در قزل‌آلای رنگین‌کمان شده باشد. در همین راستا طی مقایسه‌ای که در مورد فاکتور وضعیت در انتهای دوره در بین تیمارهای‌مختلف‌صورت پذیرفت، مشاهده گردید بیش‌ترین میزان فاکتور وضعیت‌مربوط به تیمار ۳ و کم‌ترین آن مربوط به تیمار ۲ بوده است. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده این مطلب باشد که اضافه کردن باکتری منجر به بهبود عملکرد جیره غذایی و کاهش ذخیره چربی در بدن ماهیان حاوی مکمل می‌شود. بالابودن CF در تیمار ۳، احتمالاً مربوط به اثر نامطلوب کیتوزان بر برخی از شاخص‌های رشد می‌باشدچراکه‌در تیمار۳ کیتوزان‌بیش‌تری‌استفاده گردید. Carnevali و همکاران (۲۰۰۴) در استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم نتایج خوبی را در افزایش بقا لارو شانک ماهی به‌دست آوردند. افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره غذایی بچه‌ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان‌به‌طور معنی‌داری‌موجب‌بهبودفاکتورهای مختلف رشد در تیمار تغذیه شده با دوز CFU ۱۰۷ باکتری بر گرم غذا نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد گردید (قلجایی‌فرد و همکاران، ۱۳۹۵). Merrifeld و همکاران (۲۰۰۹) پیشرفت معنی‌داری در عملکرد رشد در گروه استفاده نموده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند، اما فاکتور وضعیت درقزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه نموده از پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود.هم‌چنین‌این‌محقق در همان‌سال اعلام کرد که اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای رشد ازجمله SGR و FCR ماهی‌های قزل‌آلای تغذیه شده با پروبیوتیک و بدون پروبیوتیک وجود دارد. ارزیابی پارامترهای خونی‌اطلاعات‌ارزشمندی‌رادرباره وضعیت سلامتی بسیاری از جانوران ازجمله ماهی‌ها فراهم می‌کند (Bani و Haghi-Vayghan، ۲۰۱۱). تغییرات فاکتورهای سلولی خون همراه با تغییر فاکتورهای محیط، امری غیرقابل انکار در ماهیان به‌دلیل خونسرد بودن آن‌ها، به‌وضوح دیده‌می‌شود(Burnt و همکاران، ۲۰۰۵). Renukaو همکاران (۲۰۱۴)،

اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماهی کاتلا *Catla catla* و Rajikkannu و همکاران (۲۰۱۵)، اثر باکتری پروبیوتیک باسیلوس پومیلوس را بر پارامترهای خونی در ماهی کپور هندی *Labeo rohita* موردبررسی قرار دادند، نتایج افزایش قابل توجهی در تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت و شاخص سلول‌های قرمز مانند MCH، MCV و MCHC را نشان داد. در مطالعه حاضر، از نظر میزان هماتوکریت بین تیمار ۲ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. میزان هماتوکریت در تیمار ۱ نیز افزایش یافته بود که این افزایش با افزایش تعداد گلبول‌های قرمز هم‌خوانی دارد. به‌علاوه تغییرات هموگلوبین در تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبوده اما تیمار ۲ و تیمار ۳، به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان هموگلوبین را نشان دادند. احتمالاً عدم معنی‌داری هموگلوبین در تیمارها را می‌توان در وضعیت غذایی یا بهداشتی ماهیان و درنتیجه کاهش حجم خون ماهیان توجیه کرد (ستاری، ۱۳۸۱). ازنظر تعداد RBC و میزان Hct، MCHC در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش را نشان دادند که فقط افزایش میزان Hct در تیمار ۲ نسبت به تیمار شاهد، تفاوت معنی‌دار بود. سهندی و همکاران (۱۳۹۴) در مطالعه تأثیر استفاده از دو گونه باکتری پروبیوتیکی *Bifidobacterium animalis* و *Bifidobacterium lactic* بر پارامترهای خونی در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان کردند که مقدار هماتوکریت، گلبول‌های قرمز و سفید در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان دادند.هم‌چنین افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین را به‌دنبال تجویز خوراکی کیتوزان در ماهی *Epinephelus bruneus* گزارش شده است (Harikrishnan و همکاران ۲۰۱۲). با توجه به روند افزایشی تعداد گلبول‌های قرمز انتظار می‌رود که شاخص MCH کاهش پیدا کند که با نتایج به‌دست آمده مطابقت دارد. افزایش مقدار MCHC در تیمارهایی که هم مقدار هموگلوبین و هم هماتوکریت کاهش یافته‌اند، نشان می‌دهد که با این‌که سلول‌ها کوچک‌تر شده‌اند و میزان هموگلوبین آن‌ها کم‌تر از گروه‌های دیگر است ولی میزان هموگلوبین نسبت به حجم خود گلبول بالاتر است. در مقابل کاهش MCHC با افزایش هر دو پارامتر هموگلوبین و هماتوکریت نشان می‌دهد اگر چه میزان هموگلوبین نسبت به سایر تیمارها افزایش یافته ولی مقدارآن نسبت به حجم خود گلبول کم‌تر است. گلبول‌های سفید خون یکی از اجزا مهم دفاع اختصاصی هستند که در خون، ارگان‌های لنفاوی و برخی بافت‌های دیگر حضور دارند و دارای فعالیت بیگانه‌خواری و تولید آنتی‌بادی می‌باشند (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). تعداد کلی WBC در تحقیق حاضر با آغاز تغذیه از جیره‌های آزمایشی افزایش یافته اما به‌جز تیمار ۳ این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود.

در مطالعه‌ای افزودن لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره غذایی توانست به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان RBC، Hb، PCV و WBC در تاس‌ماهی سیبری در مقایسه با ماهیان گروه شاهد گردد. براساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بیان شد که بالا بودن تعداد WBC نشان‌دهنده تولید فاکتورهای ایمنی توسط گلبول‌های سفید (لکوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها) و به تبع آن تولید IgM، ایمنوگلوبولین و لیزوزیم خواهد بود. هم‌چنین بالابودن RBC خون در تیمارهای حاوی باکتری اسید لاکتیک نسبت به گروه شاهد می‌تواند بیانگر سلامت و تقویت سیستم خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و افزایش سطح اکسیژن‌رسانی در آبشش‌ها در شرایط استرس‌زا نظیر کاهش اکسیژن و تغییرات محیطی دیگر باشد (Pourgholam و همکاران، ۲۰۱۶). یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده می‌تواند موجب بهبود برخی شاخص‌های رشد، تغذیه و فاکتورهای خونی شود اما باید تحقیقاتی در جهت استفاده بهینه از آن و کسب نتایج مطمئن، صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان محترم بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که امکانات اجرایی این تحقیق را تقبل نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

۱. **اسمعیلی، س.؛ سهراب‌وندی، س.؛ مرتضویان، س.ا.م.؛ نعمت الهی، آ.؛ شادنوش، م. و ایوانی، ج.، ۱۳۹۴.** مروری بر کارایی ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها. فصلنامه طب و تزکیه. دوره ۲۴، شماره ۳، صفحات ۹ تا ۲۲.

۲. **حسینی، س.ص.، ۱۳۹۵.** ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک ایمنی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* ریزپوشانی شده با آلژینات/ کیتوزان در فیل‌ماهی جوان *Huso huso*. پایان‌نامه دکتری تخصصی. بخش آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۳۷ صفحه.

۳. **رضایی‌مکرم، ر.؛ مرتضوی، س.ع.؛ حبیبی‌نجفی، م.ب.؛ شهیدی، ف. و خمیری، م.، ۱۳۸۹.** اثر میکروانکپسولاسیون آلژینات کلسیم بر قابلیت زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC۱۶۴۳ در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده انسان. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۵۱ تا ۶۰.

۴. **ستاری، م.، ۱۳۸۱.** کتاب ماهی‌شناسی(۱) (تشریح و فیزیولوژی). انتشارات نقش مهر دانشگاه گیلان. صفحات ۱۰۵ تا ۱۷۶.

۵. **سهندی، ج.؛ جعفریان، ح. ا.؛ سلطانی، م. و ابراهیمی، پ. ، ۱۳۹۴.** مطالعه شاخص‌های رشد و پارامترهای خون شناختی لارو

قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره مکمل سازی شده با بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی. مجله علمی پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی. دوره ۴، شماره ۳. صفحات ۴۱ تا ۵۱.

۶. **قلجایی‌فرد، ا.؛ خارا، ح. و شناورماسوله، ع.، ۱۳۹۵**. تأثیر باکتری (*Lactobacillus plantarum*) جداسازی شده از روده قزل آلای رنگین‌کمان استان گیلان بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. فیزیولوژی و تکوین جانوری. دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۴.

۷. **محمدیان، ت.؛ قربانپور، م.؛ علیشاهی، م.؛ تابنده، م.ر. و غریبی، د.، ۱۳۹۴**. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت. دامپزشکی ایران. دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۸۸ تا ۹۸.

۸. **Aubin, J.; Gatesoupe, F.J.; Labbe, L. and Lebrun, L., 2005.** Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture research. Vol. 36, pp: 758-767.

۹. **Bagheri, T.; Hedayati, S.A.; Yavari, V.; Alizadeh, M. and Farzanfar, A., 2008.** Growth, Survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two month first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 8, pp: 43-48.

۱۰. **Bani, A. and Haghi-Vayghan, A. 2011.**Temporal variations in haematologicaland biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. Journal of Ichthyol ogycal Research.Vol. 58, pp: 126-133.

۱۱. **Brunt, J. and Austin, B., 2005.** Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococosis in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). Jouranl of Fish Diseases. Vol. 28, pp: 693-701.

۱۲. **Carnevali, O.; Zamponi, M.C.; Sulpizio, R.; Rollo, A.; Nardi, M.; Orpianesi, C.; Silvi, S.; Caggiano, M.; Cho, C.Y. and Kaushik, S., 1990.** Nutritional energetic in fish, energy and protein utilization in rainbow trout. World Review of Nutrition and Dietetics Journal. Vol. 61, pp: 132-172.

۱۳. **Cerezuela, R.; Meseguer, J. and Esteban, M.A., 2013.** Effects of dietary inulin, *Bacillus subtil*is and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 34, pp: 843-848.

۱۴. **Dimitroglou, A.; Merrifield, D.L.; Carnevali, O.; Picchietti, S.; Avella, M.; Daniels C.; Guroy, D. and Davies, S.J., 2011.** Microbial manipulations to improve fish health and production -a Mediterranean perspective. Fish Shellfish Immunology. Vol. 30, pp: 1-16.

۱۵. **Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C. 2000.** Schalm's Veterinary Hematology. 5rdEd. Lippincott Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA. pp: 1120-1126.

۱۶. **Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology. Vol. 66. No. 5, pp: 365-378.

۱۷. **Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. Vol. 180, No. 1, pp: 147-165.

۱۸. **Ghosh, K.; Sen, S.K. and Ray, A.K., 2003.** Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *Bacillus circulans*, in formulated diets for rohu, *Labeo rohita*, fingerlings. Israeli J of Aquaculture. Vol. 55, pp: 13-21.

۱۹. **Hagi, T.; Tanaka, D.; Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004.** Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture. Vol. 234, No. 1, pp: 335-346.

۲۰. **Harikrishnan, R.; Kim, J.S.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquaculture. Vol. 326, pp: 46-52.

۲۱. **Henry, J.B., 1996.** Clinical diagnosis and management by laboratory methods. W.B. Saunders Company. 1556 P.

۲۲. **Huiyi, S.; Weiting, Y.; Meng, G.; Xiudong, L. and Xiaojun, M., 2013.** Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohudrate polymers. Vol. 96, pp: 181-189.

۲۳. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease. Vol. 25, pp: 633-642.

۲۴. **Iyer, R. and Hittinahalli, V., 2008.** Modified Pap method to among methicillin resistant *Staphylococcus aureu*s isolates tertiary care hospital. Journal of Medical Microbiology. Vol. 26, pp: 176-179.

۲۵. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press. 395 P.

۲۶. **Jafaryan, H.; Taati keley, M. and Nazarpoor, A.R., 2009.** The study effect of probioic bacillus on growth of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae via Supplementation with meal of *Daphnia magna*. Journal Agricultural Science Natural Research. Vol. 16, pp: 48-59.

۲۷. **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.Vol. 22, pp:141-150.

۲۸. **Mortazavian, A.; Razavi, SH.; Ehsani, M.R. and Sohrabvandi, S., 2007.** Principles and methods of microencapsulation of Probiotic microorganisms. Iranian Journal of biotechnology. Vol. 5, No. 1, pp:1-18.

۲۹. **Naseri, S.; Nezami Balouchi, SH.A.; Khara, H.; Farzanfar, A.; Lashtou Aghaei, GH.R. and Shakoori, M., 2008.** The study of growth performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae with different levels of probiotic and iron in use of supplemented in diet. Journal of fisheries. Vol. 2, No. 3, pp: 15-20.

۳۰. **Ogino, C. and Saito, K., 1970.** Protein nutrition in fish. I. The utilization of dietary protein by young carp. Bulletin of Japanese Society for the Science of Fish. Vol. 36, pp:250-254.

۳۱. **Ohashi, Y.; Umesaki, Y. and Ushida, K. 2004.** Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain shirota, in the gastrointestinal tract of a Pig. International Journal of Food Microbiology. Vol. 96, pp: 61-66.

۳۲. **Planas, M.; Vazquez, J.A.; Marques, J.; Peres-Lomba, R.; Gonzalez, M.P. and Murado, M., 2004.** Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture. Vol. 240, pp: 313-329.

۳۳. **Pourgholam, M.A.; Khara, H.; Safari, R.; Sadati, M.A.Y. and Aramli, M.S., 2016.** Hemato-Immunological Responses and Disease Resistance in Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* Fed on a Supplemented Diet of *Lactobacillus plantarum*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. pp: 1-9.

۳۴. **Rajikkannu, M.; Natarajan, N.; Santhanam, P.; Deivasigamani, B.; Ilamathi, J. and Janani, S., 2015.** Effect of probiotics on the haematological parameters of Indian major carp (*Labeo rohita*). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. Vol. 2, No. 5, pp: 105-109.

۳۵. **Renuka, K.P.; Venkateshwarlu, M. and Naik, A.R., 2014.** Effect of probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on haematological parameters of *Catla catla* (Hamilton). International Journal Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 8, pp: 326-335.

۳۶. **Shenavar Masouleh, A., 2013.** Characterization of lactic acid bacteria in intestine of Persian sturgeon fingelings and their efficiency on the growth performances and some immunophysiological variable. Thesis submitted for Degree of Ph.D. Faculty of Aquatic Animal Health Veterinary Medicine, University of Tehran. 140 P.

۳۷. **Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Peiris, P. and Kailasapathy, K., 2000.** Encapsulation of probiotic bacteria with alginate starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology. Vol. 62, No. 1, pp: 47-55.

۳۸. **Taoka, Y.; Maeda, H.; Jo, J.Y.; Jeon, M.J.; Bai, S.C.; Lee, W.J.; Yuge, K. and Koshio, S., 2006.** Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthysoliraceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fisheries Science. Vol. 72, No. 2, pp: 310-321.

۳۹. **Thrall, M.A.; Baker, D.C. and Lassen, E.D., 2005.** Clinical Case Presentations forVeterinary Hematology and Clinical Chemistry. John Wiley and Sons. USA. 100 P.

۴۰. **Tuohy, K.M.; Abecia, L.; Deaville, E.R.; Fava, F.; Klinder, A. and Shen, Q., 2009.** Molecular Tools for Investigating the Gut Microbiota. In Prebiotics and probiotics science and technology. Edited by D. Charalampopoulos and RA Rastall. Springer. New York. Vol. 1, pp: 61-73.

۴۱. **Verschuere, L.; Rombaut, G.; Huys, G.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 1999.** Microbial Control of the Culture ofArtemia Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. Applied and environmental microbiology. Vol. 65, No. 6, pp: 2527-2533.

۴۲. **Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006.** Probiotics in marine larviculture. FEMS microbiological Reviews. Vol. 30, pp: 404-427.