13 (3) 261-268, Autumn 2021

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effectiveness of *Bacillus subtilis* on growth and survival of common carp larva in non-earthen ponds

Mehran Avekh Keysami [*1], ***Afshar Zoughi Shalmani*** [1], ***Mohammadreza Azmoodeh Mojdehi*** [2]

[1] *Aquatics and Fisheries Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Rasht, Iran*

[2] *Gilan General Fisheries Department, Iran Fisheries Organization, Bandar Anzali, Iran*

Key Words

Bacillus subtilis
Larva *Cyprinus carpio*
Probiotic
Feeding
Non earthen pond

Abstract

Introduction: A feeding experiment was conducted to investigate the effect of *Bacillus subtilis* bacterium and its suitable level on survival and growth rate of larva *Cyprinus carpio* Mirzakoochek fisheries education center**.**

Materials & Methods: *B. subtilis* bacterium isolated from *Cyprinus carpio* intestine was added to commercial carp feed as a probiotic. Five diets were prepared by soaking carp feed in to the *B. subtilis* suspension to achieve 10^4, 10^5, 10^6 and 10^7 levels with a non-treated control.

Result: After 28 days, the larva carp fed diet at level 10^6, showed a higher mean weight gain (1196.43mg). The mean weight gain showed a decreasing trend as the *B. subtilis* level decreased and increased from 10^6 in the diets. There were significant differences ($P<0.05$) in weight gain, daily growth and feed conversion ratio (FCR) among treated and control groups. There were significant differences ($P<0.05$) among treatments and control in survival rate but no significant differences ($P>0.05$) in water quality and biochemical composition among treated and control groups.

Conclusion: It was concluded that the tested strain may be a promising probiotics for larva *C. carpio* at a level of 10^6 *B. subtillis* in to the carp feed.

* Corresponding Author's email: dr.keysami@gmail.com

Received: 27 June 2020; Reviewed: 29 July 2020; Revised: 1 October 2020; Accepted: 13 November 2020

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.253319.2380

مقاله پژوهشی

اثربخشی باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* بر رشد و بازماندگی لارو ماهی کپورمعمولی در حوضچه‌های غیرخاکی

مهران آوخ کیسمی[1*]، افشار نوقی‌شلمانی[1]، محمدرضا آزموده‌مژدهی[2]

[1] بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

[2] اداره کل شیلات گیلان، سازمان شیلات ایران، بندرانزلی، ایران

کلمات کلیدی

Bacillus subtilis
لارو کپور معمولی
پروبیوتیک
تغذیه
حوضچه غیر خاکی

چکیده

مقدمه: این تحقیق به‌منظور بررسی تاثیر باکتری *Bacillus subtilis* و غلظت مناسب آن بر رشد و درصد بقای لارو ماهی کپورمعمولی در مرکز آموزش علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان اجراء گردید.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش باکتری جدا شده از دستگاه گوارش ماهی کپورمعمولی به غذای تجاری پودری به‌عنوان پروبیوتیک اضافه گردید. با خیساندن غذای ماهی درسوسپانسیون باکتری مذکور، ۵ نوع جیره با غلظت‌های مختلف باسیلوس در غذا شامل: 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 سلول درگرم غذا و شاهد بدون باکتری باسیلوس تهیه شد.

نتایج: بعد از ۲۸ روز غذا دهی، لاروهایی که با باسیلوس با غلظت 10^6 تغذیه شده بودند، بیش‌ترین افزایش وزن (۱۱۹۶/۴۳میلی‌گرم) را نشان دادند. میانگین افزایش وزن در تیمارها در غلظت‌های پائین‌تر و بالاتر از 10^6 کاهش داشت. هم‌چنین در افزایش وزن، رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0/05$). درصد بقاء بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) لیکن درکیفیت آب و ترکیب بیوشیمیایی لاشه لارو کپور بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P>0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: براساس نتایج به‌دست آمده، باکتری *B. subtilis* به‌کار رفته در این تحقیق به‌عنوان یک پروبیوتیک با غلظت 10^6 سلول درگرم در غذای لارو کپورمعمولی پیشنهاد می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.keysami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۷ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۸ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۰ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ آبان ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.253319.2380

مقدمه

افزایش تقاضا و مصرف آبزیان موجب گذار سیستم‌های آبزی پروری از حالت گسترده به سیستم‌های نیمه متراکم و متراکم گردیده است. در این راستا با صنعتی شدن و افزایش تراکم ذخیره‌سازی در مزارع پرورشی، ظهور انواع بیماری‌ها عمده‌ترین چالش پیش روی آبزی‌پروری است (Bondad Reantaso و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با هدف کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا عوارض سوء بر موجودات میکروبی سیستم‌های آبزی‌پروری، اثرات آلایندگی برطبیعت و مقاومت آنتی‌بیوتیک حتی به‌داروهای آنتی‌بیوتیک عمومی پر مصرف می‌گردد (Resende و همکاران، ۲۰۱۲)، هم‌چنین بر باکتری‌های مفید طبیعی نیز تأثیرات منفی برجای می‌گذارد (He و همکاران، ۲۰۱۰، ۲۰۱۱، ۲۰۱۲). امروزه پروبیوتیک‌ها یا مکمل‌های میکروبی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها قرار می‌گیرند. پروبیوتیک‌ها سلول‌های زنده‌اند که تأثیرات مثبت بر سلامت میزبان از طریق متعادل نمودن فلور میکروبی دستگاه گوارش، بهبود مصرف غذا، مشارکت آنزیمی در هضم، بازدارنده میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ضدموتاسیون و سرطان زایی، ارتقاء شاخص‌های رشد و تحریک سیستم ایمنی می‌باشند (Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰). باکتری‌های پروبیوتیک موجود در دستگاه گوارش ماهی، هم‌چنین سبب افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان می‌شوند که درنهایت منجر به افزایش قابلیت هضم چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در جیره غذایی شده و کارایی تغذیه و متعاقب آن، رشد را در ماهی میزبان به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (Ziaei-nejad و همکاران، ۲۰۰۶). اغلب پروبیوتیک‌های تجاری مورد استفاده در آبزی‌پروری، مستخرج از دستگاه گوارش موجودات خشکی‌زی می‌باشند. بدین‌ترتیب صنعت آبزی‌پروری بدون آگاهی از پیامدهای مضر احتمالی موجب ورود گونه‌های باکتریایی غیربومی به محیط طبیعی آبزیان می‌گردد (Nayak، ۲۰۱۰). در مدیریت نوین میکروبی، گونه‌های بومی جدا شده از دستگاه گوارش آبزیان، نقش بسیار مهمی را در اهداف آبزی‌پروری ایفاء نموده است. از آن‌جا که جنس *Bacillus* به عنوان پاتوژن ارگانیسم‌های آبزی تابه‌حال گزارش نشده‌است (Moriarty، ۱۹۹۸) کاربرد آن به‌طور وسیعی در صنعت آبزی‌پروری پذیرفته شده است (Gullian، ۲۰۰۴). باسیلوس‌های پروبیوتیکی از طریق فعالیت‌های متابولیکی خود در دستگاه گوارش لاروهای فیل‌ماهی موجب بهبود کارآیی تغذیه و بازده رشد می‌گردند (Jafarian، ۲۰۰۷). رحمتی‌اندانی و همکاران (۱۳۹۰) ثابت کردند که رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر بیماری‌های باکتریایی به‌طور معنی‌داری به‌دنبال تغذیه با پروبیوتیک‌های *Lactobacillus casei*، *L. paracasei* و *L. planarum* جدا شده از روده ماهی کپورمعمولی افزایش می‌یابد. به علاوه در تحقیق دیگری مشخص گردید که پروبیوتیک‌های تجاری *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* قادر به بهبود درصد بقاء، ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی و افزایش تعداد باسیلوس‌های دستگاه گوارش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشند (Bagheri، ۲۰۰۸). Wang و همکاران (۲۰۰۸) با کاربرد باکتری‌های پروبیوتیکی در ماهی تیلاپیای نیل شاهد افزایش عملکرد رشد و کارایی بیش‌تر سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا شدند. Merifield و همکاران (۲۰۱۰) با کاربرد سه سویه از باکتری‌های پروبیوتیکی (*Bacillus subtilis* و *Enterococcus faecium* و *Bacillus subtilis*) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در طی ۱۰ هفته شاهد افزایش کارایی رشد و تغذیه و ارتقاء وضعیت سلامتی ماهی شدند. مدبری و همکاران (۱۳۹۱) بیان نمودند که پروبیوتیک باکتوسل موجب بهبود رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. کلیائی و همکاران (۱۳۹۵) دریافتند که اضافه کردن پروبیوتیک *Bacillus subtilis* به جیره ماهیان جوان کپور معمولی، اثرات مثبتی بر پارامترهای رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای دارد. مطالعات زیادی در رابطه با اثر پروبیوتیک‌ها بر روی ماهیان مختلف و آبزیان صورت گرفته است (احمدمرادی و همکاران، ۱۳۹۸). اما به‌نظر می‌رسد هنوز در خصوص کاربرد آن‌ها در افزایش تولید و پرورش لارو ماهیان کار زیادی صورت نگرفته و نیازمند انجام تحقیقات بیش‌تر می‌باشد، لذا در این تحقیق، به بررسی نقش و اثرات پروبیوتیک باسیلوس مستخرج از روده ماهی جوان کپورمعمولی، در بهبود شاخص‌های رشد و بقاء لارو آن در حوضچه‌های غیرخاکی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش: به‌منظور بررسی تاثیر باکتری *B. subtilis* و غلظت مناسب آن روی درصد بقاء و رشد لارو ماهی کپورمعمولی، چهار تیمار آزمایشی شامل: ۱- باسیلوس در گرم غذای لارو جیره با غلظت ۵×۱۰^{۴} (PF1) ۲- باسیلوس در گرم غذای لارو جیره با غلظت ۵×۱۰^{۵} (PF2) ۳- باسیلوس در گرم غذای لاروجیره با غلظت ۵×۱۰^{۶} (PF3) ۴- باسیلوس در گرم غذای لارو جیره با غلظت ۵×۱۰^{۷} (PF4) و یک تیمار شاهد بدون اضافه کردن باسیلوس (CF)، هر یک با ۳ تکرار برای این آزمایش درنظر گرفته شد. تعداد ۱۵ عدد مخزن ۳۰۰ لیتری دارای ورودی و خروجی آب انتخاب گردید. لاروهای ۱۵ روزه کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۳/۹۳±۵۶۳/۶۴ میلی‌گرم به تعداد ۶۲ عدد در هر لیتر به هر حوضچه معرفی گردید. جریان آب ورودی ۰/۱ لیتر در ثانیه بود. سپس لاروهای کپورمعمولی از جیره‌های شاهد و تیمار تغذیه نمودند. لاروها با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ گرم با لیوان مدرج وزن شدند (AND, EK 1200,

(Japan. باکتری پروبیوتیکی مورد استفاده در این آزمایش از آزمایشگاه مرکز میرزا کوچک خان از پروژه تخصصی (کریمی، ۱۳۹۶) تهیه شد. این فرآورده میکروبی، *Bacillus subtilis* بوده و کشت های باکتریایی در محیط کشت (TSA) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و پس از آن تعداد پرگنه‌های تشکیل شده در هر پلیت شمارش و تعداد به‌ازای هر میلی‌لیتر تعیین گردید (Rengpipat و همکاران، ۱۹۹۸). از هر یک از سوسپانسیون‌های های تهیه شده با سمپلر برداشته و پس از اضافه نمودن آب مقطر و تهیه غلظت‌های مختلف از باکتری، چهار غلظت تهیه شد (10^4، 10^5، 10^6، 10^7 سلول بر گرم غذا). جیره‌های تهیه شده به خوبی با باکتری‌ها هم‌زده شده و سپس در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ ساعت خشک گردید (Keysami و همکاران، ۲۰۱۲) ، سپس براساس برنامه زمان‌بندی غذایی به‌صورت ۳ وعده در روز در اختیار لاروها قرار گرفت. جیره لاروهای کپورمعمولی در تیمار شاهد با استفاده از فرآیند ذکر شده ساخته شد، ولی به آن‌ها هیچ‌گونه باسیلوس پروبیوتیکی اضافه نگردید. باقی‌مانده غذایی نیز با دقت از مخازن پرورشی جمع‌آوری شد. این مقدار غذای جمع‌آوری شده از کل غذای عرضه شده کسر و غذای خورده‌شده‌روزانه‌محاسبه گردید. زیست‌سنجی ماهیان به‌صورت هفتگی و به‌روش وزن‌سنجی انجام گرفت (Keysami و همکاران، ۲۰۱۲). وزن متوسط لاروهای کپورمعمولی درشروع آزمایش در ۳ مخزن گروه شاهد ^{a}۵۶۳/۶۴±۳/۹۳ میلی‌گرم بود. وزن متوسط لاروها در تیمارهایی که باسیلوس به آن‌ها اضافه گردید ۵۶۳/۲۵±۰/۶۷ میلی‌گرم بود که با میانگین وزنی گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. لاروهای کپور به منظور سازگاری با شرایط آزمایش به‌مدت ۳ روز با ۳ وعده در روز با غذای پودری،غذادهی و در شرایط آزمایش نگه‌داری‌شدند. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار اجرا گردید. لاروها با غذای تجاری پودری با غلظت‌های مختلف باسیلوس در طی مدت ۲۸ روز تغذیه شدند. میزان غذادهی میزان غذادهی به‌طور روزانه با توجه به میزان مصرف غذا در مخازن ۸-۵ درصد وزن بدن لاروها درنظر گرفته شد. غذادهی در ساعت‌های ۶ صبح به‌میزان ۳۰ درصد، ۱۲ ظهر به میزان ۴۰ درصد، ۶ غروب به‌میزان ۳۰ درصد به لاروها داده شد. غلظت‌های مختلف باسیلوس براساس کارهای قبلی پژوهشگران به غذای لارو کپور اضافه گردید (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Meunpol و همکاران، ۲۰۰۳؛ Keysami و همکاران، ۲۰۰۷). مخازن با جریان آب یکسان هوادهی شدند. روشنایی به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای مخازن درنظر گرفته شد. هر هفته یک‌بار نمونه‌برداری و وزن لاروها اندازه‌گیری و درصد بقاء لاروها با جمع‌آوری تلفات مخازن به‌طور روزانه برآورد گردید.

تعیین شاخص‌های رشد: متغیرهای رشد لاروها با استفاده از روابط زیر به‌دست آمد (Felix و Sudharsan، ۲۰۰۴)

وزن آغازی (گرم) - وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن (گرم)

= افزایش وزن (٪)

۱۰۰ ×[وزن آغازی (گرم) ÷ {وزن آغازی (گرم) - وزن نهایی (گرم)}]

= ضریب تبدیل غذایی

وزن تر به‌دست آمده (گرم)÷مجموع غذای داده شده (گرم)

= ضریب رشد ویژه (٪)

۱۰۰×[طول دوره پرورش (روز)÷(لگاریتم نپرین وزن اولیه-لگاریتم‌نپرین وزن نهایی)]

= بقاء (٪)

۱۰۰×(تعداد لاروذخیره‌سازی در شروع آزمایش÷تعداد لارو باقی‌مانده در پایان آزمایش)

تجزیه تقریبی ترکیب بیوشیمیایی بدن: رطوبت، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و فیبر خام در جیره شاهد و جیره تیمار و بافت بدن لارو براساس استاندارد (AOAC، ۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد. رطوبت با روش خشک کردن در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت‌اندازه‌گیری شد. پروتئین با روش کجلدال بعداز هضم توسط اسید و چربی خام در سوکسوله با حل کردن در اتر ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۸ ساعت به‌دست آمد. فیبر خام بعد از چربی‌گیری از نمونه و هضم در اسیدسولفوریک ۱/۲۵ درصد و سود ۱/۲۵ درصدو خاکستر با سوزاندن نمونه در کوره ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. ماده خشک براساس فرمول زیر برآورد گردید.

=درصد ماده خشک

(رطوبت+ فیبر خام خاکستر+چربی خام+پروتئین خام)-۱۰۰

متغیرهای کیفیت آب: کیفیت آب به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. دمای آب (درجه سانتی‌گراد)، و pH به‌وسیله یک دستگاه pH متر و درجه حرارت‌سنج مدل YSI اندازه‌گیری گردید. اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر) نیز با اکسیژن متر YSI، مدل ۵V (USA) و آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از آمونیاک سنج هانا (Taiwan, HI ۹۳۷۱۵) اندازه‌گیری گردید .

مطالعه باکتریایی: ۳۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم از لاروهای زنده و آب مخازن پرورش دو بار در هفته (۸ مرحله)، از نخستین روز غذادهی برای شمارش باکتریایی نمونه‌برداری گردید. شمارش باکتریایی لاروها با تهیه رقت‌های سریالی درمحلول نرمال سالین (Nacl ۸/۵g/l) در ۱۰رقت و سپس در نوترنیت آگار و TSA پخش می‌شود. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت از پرورش کشت باکتریایی در دمای۳۲درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های رشد یافته شمارش و ثبت گردیدند. باکتری‌های جداسازی شده‌بااستفاده‌ازتست‌های‌بیوشیمیایی‌مجدداآزمایش‌شدند (Keysami و همکاران، ۲۰۰۷).

آنالیز آماری: به‌منظور آنالیز آماری داده-های متغیرهای رشد، ترکیبات بیوشیمیایی لاشه، داده‌های کیفیت آب، شمارش باکتریایی لاشه‌وآب‌بین‌تکرارهاوتیمارها ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov Smirnov، نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد، برای بررسی اختلاف یا عدم اختلاف بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و متعاقب آن آزمون post-hoc LSD استفاده شد. سطوح معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ بررسی گردیدند. مقایسه داده‌های حاصل از نتایج براساس میانگین با محاسبه‌میزان انحراف معیار (sd±میانگین) ارائه شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ (SPSS, Inc., USA) انجام پذیرفت.

نتایج

متغیرهای فیزیکوشیمیایی: متغیرهای فیزیکوشیمیایی دمای آب، اکسیژن محلول، pH و آمونیاک به‌ترتیب در محدوده ۳۰-۲۶ درجه‌سانتی‌گراد، ۸/۷-۷/۳ میلی‌گرم‌درلیتر، ۷/۳-۷/۲ و ۰/۰۲-۰/۰۱۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده نرمال بوده و در محدوده کیفیت مناسب پرورش لارو کپورمعمولی است (Abdel-Tawwab و همکاران، ۲۰۰۸). باسیلوس سابتیلیس تاثیر معنی‌داری روی کیفیت فیزیکوشیمیایی آب پرورش این لاروها نداشته است. بین کیفیت آب گروه‌های تیمار و شاهد و هم‌چنین بین کیفیت آب تیمارهای مختلف نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P >۰/۰۵).

ترکیب بیوشیمیایی جیره‌ها و لاروها: بالاترین و پائین‌ترین میزان پروتئین بافت‌ها به‌ترتیب: PF3، با ۱۷/۱۳٪ و PF4، با ۱۶/۱۵٪ بود. میزان چربی خام در PF4 بالاترین (۷/۸۶٪) و در تیمار PF۲ پائین‌ترین (۷/۷۱٪) را نشان داد. نتایج نشان داد که اختلاف‌معنی‌داری بین ترکیب بیوشیمیایی جیره‌ها و لاشه لاروهای تیمارها و شاهد در ۲۸ روز غذادهی وجود ندارد (P>۰/۰۵). ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایش و لاشه لاروها در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱: ترکیبات بیوشیمیایی جیره‌های تهیه شده از غلظت‌های مختلف *Bacillus subtilis*

متغیر	CF	PF1	PF2	PF3	PF4
پروتئین خام	۳۴/۹۳^a	۳۵/۰۷^a	۳۵/۰۲^a	۳۴/۸۹^a	۳۴/۹۱^a
SD (±)	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۷	۰/۰۵
چربی خام	۱۶/۷۹^a	۱۶/۸^a	۱۶/۹۲^a	۱۶/۳۸^a	۱۶/۴۶^a
SD (±)	۰/۱۳	۰/۳۱	۰/۰۶	۰/۵۲	۰/۴۶
فیبرخام	۸/۳^a	۸/۴۲^a	۸/۴۹^a	۸/۲۲^a	۸/۲۵^a
SD (±)	۰/۰۵	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۱۲
خاکستر	۷/۲۱^a	۷/۲^a	۷/۲۸^a	۷/۳۸^a	۷./۳۶^a
SD (±)	۰/۰۸	۰/۲۳	۰/۱۶	۰/۲۶	۰/۲۷
ماده خشک	۳۲/۷۷^a	۳۲/۵۱^a	۳۲/۲۹^a	۳۳/۱۲^a	۳۳/۰۲^a
SD (±)	۰/۰۷	۰/۵۹	۰/۴۳	۰/۹	۰/۷۲

- حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P <۰/۰۵)، -PF : پروبیوتیک فید یا غذای پروبیوتیک‌دار،
- پروتئین خام (N% x ۶/۲۵)، - ماده خشک (100 – CP%- lipid% - CF%-ash%)

جدول ۲: ترکیب بیوشیمیایی لاشه لارو کپورمعمولی براساس وزن خشک تحت تاثیر تغذیه با جیره‌های با غلظت مختلف *Bacillus subtilis* و شاهد

متغیر	اولیه	CF	PF1	PF2	PF3	PF4
پروتئین خام	۱۶/۶۵^a	۱۶/۶۳^a	۱۶/۶۷^a	۱۶/۷۱^a	۱۷/۱۳^a	۱۶/۱۵^a
SD (±)	۰/۶۸	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۰۹	۰/۴۹	۰/۱۹
چربی خام	۷/۶۷^a	۷/۷۳^a	۷/۷۵^a	۷/۷۱^a	۷/۸۳^a	۷/۸۶^a
SD (±)	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۹
خاکستر	۱۳/۹۳^a	۱۴/۵۵^a	۱۴/۸۱^a	۱۴/۱۳^a	۱۴/۲۲^a	۱۴/۴۳^a
SD (±)	۰/۵۵	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۱۱	۰/۲۸	۰/۲۹
ماده خشک	۱۷/۹۳^a	۱۴/۳۸^a	۱۳/۵۷^a	۱۳/۶۳^a	۱۳/۸۶^a	۱۵/۳۷^a
SD (±)	۰/۷۸	۰/۰۶	۰/۶۱	۰/۴	۰/۷۷	۰/۲۱
رطوبت	۷۵/۲۴^a	۷۵/۳۳^a	۷۵/۲۳^a	۷۵/۶^a	۷۵/۰۳^a	۷۴/۶^a
SD (±)	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۸۱	۰/۴۴	۰/۳۲	۰/۷

- حروف غیرهمسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)، -PF: پروبیوتیک فید یا غذای پروبیوتیک‌دار، - پروتئین خام (N% x ۶/۲۵)

متغیرهای رشد: از میان ۴ سطح مختلف باسیلوس سابتیلیس درجیره تیمارهای 10^{7}، 10^{6}، 10^{5} و 10^{4} به‌طور معنی‌داری متغیرهای رشد را نسبت به شاهد بهبود بخشیدند. لاروهای کپورمعمولی PF3 میانگین افزایش وزن بالاتری (۴۳/۴۵±۱۱۹۶/۲ میلی‌گرم) را نشان دادند. میانگین افزایش‌وزن لاروهای کپورمعمولی وقتی‌که سطح جیره از غلظت‌های کم‌تر از 10^{6} سلول در گرم غذا و بیش‌تر از آن، کاهش داشت. مشابه چنین کاهشی در مورد ضریب رشد ویژه نیز اتفاق افتاد. در مورد متغیرهای ضریب رشد ویژه، افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی و هم‌چنین بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت (P<۰/۰۵). بالاترین FCR (۰/۰۵±۰/۶۸) در جیره شاهد و پایین‌ترین‌میزان‌درجیره PF3 مشاهده‌گردید. به‌طورکلی‌رشد و ضریب تبدیل غذایی لاروهای کپورمعمولی در همه جیره‌های که باسیلوس داشتند از جیره شاهد بالاتر بود. بعد از ۲۸ روز غذادهی، میانگین افزایش وزن تیمارهایی که باسیلوس داشتند ۱۰۱۳/۲۹ میلی‌گرم به‌دست آمد. اختلاف معنی‌داری بین تیمار PF3 با PF4 مشاهده شد (P<۰/۰۵). میانگین درصد بقاء تیمارها (۹۷/۷٪) به‌طور معنی‌داری از درصد بقاء در شاهد (۴/۹۷±۹۶/۰٪) بالاتر بود. بنابراین اضافه کردن *B. subtilis* به جیره لاروها باعث افزایش رشد و درصد بقاء لاروهای کپورمعمولی گردید. تیمارهای با سطوح مختلف *B. subtilis* دارای نتایج مشابهی بدون اختلاف معنی‌دار آماری (P>۰/۰۵) در افزایش رشد و درصد بقاء لاروها نشان دادند. متغیرهای رشد اندازه‌گیری شده در این تحقیق در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳: نتایج شاخص‌های رشد لارو تغذیه شده با غلظت‌های مختلف *Bacilus subtilis* درجیره شاهد و تیمارهای مختلف

شاخص رشد	تیمار شاهد (CF)	تیمار۱ (PF1)	تیمار۲ (PF2)	تیمار۳ (PF3)	تیمار۴ (PF4)
میانگین وزن اولیه (میلی‌گرم)	۵۶۳/۶۴±۳/۹۳^{a}	۵۶۴/۵±۰/۹۵^{a}	۵۶۵/۴±۲/۴۷^{a}	۵۶۷/۴۳±۰/۵۲^{a}	۵۵۷/۶±۱/۶۱^{a}
میانگین وزن نهایی (میلی‌گرم)	۱۲۹۳/۸±۲/۹۱^{a}	۱۵۳۳/۱±۳/۵۹^{b}	۱۵۴۶/۵±۲/۵۲^{b}	۱۷۶۲/۸۷±۲/۹۴^{ab}	۱۴۶۲/۷۳±۱/۹۹^{c}
میانگین افزایش وزن بدن (میلی‌گرم)	۷۳۰/۱۶±۷/۳۳^{a}	۹۷۰/۵±۴/۴۵^{b}	۹۸۱/۱±۴/۳۲^{b}	۱۱۹۶/۴۳±۲/۴۵^{b}	۹۰۵/۱۳±۲/۸۲^{c}
درصد افزایش وزن (٪)	۱۲۵/۳۴±۸/۴۲^{a}	۱۷۱/۰۸۱±۴/۹۳^{b}	۱۷۳/۵۵±۷/۵۵^{b}	۲۱۰/۶۳±۰/۵۸^{ab}	۱۶۲/۶۱±۴/۷۴^{c}
ضریب تبدیل غذا	۰/۶۸±۰/۰۵^{a}	۰/۵۸±۰/۰۱^{b}	۰/۵۸±۰/۰۲^{b}	۰/۳۸±۰/۰۰۶^{ab}	۰/۵۴±۰/۰۱^{b}
ضریب رشد ویژه	۶/۸۲±۰/۰۴۷^{a}	۷/۱۵±۰/۰۱۷^{b}	۷/۱۸±۰/۰۳^{b}	۷/۲۲±۰/۰۰۳^{b}	۷/۰۲±۰/۰۲^{c}
درصد بقاء (٪)	۹۶/۴±۰/۹۷^{a}	۹۸/۲±۱/۱۹^{b}	۹۸/۸±۰/۹۱^{b}	۹۸/۰۰±۰/۹۹^{b}	۹۵/۸±۱/۹۵^{a}

- حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)،:

جدول ۴: لگاریتم تعداد باکتری‌های کل باسیلوس و باکتری‌های گرم منفی شمارش شده از لاشه لاروهای کپورمعمولی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف *B. subtilis* در تیمار و شاهد

شاخص	مراحل شمارش	CF	PF1	PF2	PF3	PF4
باکتری‌های کل (سلول در گرم)	۰	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶
	۲	۳/۹	۵/۷	۵/۷	۵/۷	۴/۳
	۴	۴/۷	۵/۹	۵/۹	۵/۹	۵/۶
	۶	۵/۳	۶/۳	۶/۳	۶/۳	۵/۹
	۸	۷/۸^{a}	۷/۸^{a}	۷/۸^{a}	۷/۸^{a}	۷/۸^{a}
باکتری‌های گرم مثبت (سلول در گرم)	۰	۱	۱	۱	۱	۱
	۲	۱	۲/۸	۲/۸	۲/۸	۲/۶
	۴	۱	۴/۶	۴/۶	۴/۶	۳/۵
	۶	۱	۶/۱	۶/۱	۶/۱	۴/۹
	۸	۱^{b}	۷/۴^{a}	۷/۴^{a}	۷/۴^{a}	۵/۹^{b}
باکتری‌های گرم منفی (سلول در گرم)	۰	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶
	۲	۳/۴	۲/۰۱	۲/۰۱	۲/۰۱	۲/۰۱
	۴	۴/۳	۲/۰۱	۲/۰۲	۲/۰۲	۲/۰۲
	۶	۴/۹	۲/۰۱	۲/۰۳	۲/۰۳	۲/۰۳
	۸	۵/۹^{b}	۲/۰۱^{a}	۲/۰۳^{a}	۲/۰۵^{a}	۳/۴^{b}

- حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

باکتری‌های لاشه و آب مخزن پرورش بعد از غذادهی با این باکتری در طی ۲۸ روز براساس تست‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی شناسایی گردید. میانگین کل باکتری‌های لاشه لاروها (10^{7} ×۳/۶±۶/۲) سلول در میلی‌گرم به‌دست آمد. تراکم باسیلوس درمخازن آب تیمار به (10^{7}×۲/۰۲±۲/۵) افزایش پیدا کرد. تراکم باسیلوس درگروه شاهد افزایش نداشت. تراکم باکتری‌های گرم منفی در گروه‌های تیمار در ۲۸ روز غذادهی به 10^{2}×۰/۳۳±۱/۱ سلول در میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد ولی میانگین تراکم باکتری‌های گرم منفی در مخازن آب شاهد (10^{5}×۱/۰^{2}±۴) سلول در میلی‌لیتر افزایش پیدا کرد (جدول ۴ و ۵).

جدول ۵: لگاریتم تعداد باکتری‌های کل باسیلوس و باکتری‌های گرم منفی شمارش شده از آب مخازن پرورش لارو تغذیه شده با غلظت‌های مختلف *Bacillus subtilis* در جیره‌های تیمار و شاهد

شاخص	مراحل شمارش	CF	PF1	PF2	PF3	PF4
باکتری‌های کل (سلول در میلی‌لیتر)	۰	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
	۲	۳/۹	۳/۹	۳/۹	۳/۹	۳/۶
	۴	۴/۳	۴/۳	۴/۳	۴/۳	۴/۱
	۶	۵/۳	۵/۳	۵/۳	۵/۳	۴/۹
	۸	۵/۹^{a}	۶^{a}	۵/۹^{a}	۵/۹^{a}	۵/۹^{a}
باکتری‌های گرم مثبت (سلول در میلی‌لیتر)	۰	۱	۱	۱	۱	۱
	۲	۱	۲/۳	۲/۳	۲/۴	۲/۳
	۴	۱	۲/۹	۳	۳/۱	۳
	۶	۱	۳/۳	۳/۵	۳/۶	۳/۲
	۸	۱^{a}	۵/۰۳^{b}	۵/۰۲^{b}	۵/۰۱^{b}	۴/۰۹^{c}
لگاریتم باکتری‌های گرم منفی شمارش شده (سلول در میلی‌لیتر)	۰	۲/۴	۲/۴	۲/۴	۲/۴	۲/۴
	۲	۲/۶	۲/۴	۲/۴	۲/۴	۲/۳
	۴	۳/۴	۲/۶	۲/۵	۲/۴	۲/۳
	۶	۵/۴^{a}	۲/۵^{b}	۲/۵^{b}	۲/۳^{b}	۴/۳^{c}
	۸	۵/۳^{b}	۲/۵	۲/۶	۲/۳	۲/۳

- حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

بحث

پروبیوتیک‌ها دارای تأثیرات مثبت بر سلامت میزبان از طریق متعادل‌نمودن‌فلورمیکروبی دستگاه‌گوارش،بهبودمصرف‌غذا، مشارکت آنزیمی‌درهضم،بازدارنده‌وتحریک‌سیستم‌ایمنی‌می‌باشند(Verschuere وهمکاران، ۲۰۰۰؛رییسی و همکاران، ۱۳۹۴). باکتری‌های پروبیوتیک موجود در دستگاه گوارش ماهی هم‌چنین، سبب افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان می‌شوند که درنهایت منجر به افزایش قابلیت هضم چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در جیره غذایی شده و کارایی تغذیه و متعاقب آن، رشد را در ماهی میزبان به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (Ziaei-nejad و همکاران، ۲۰۰۶). خاصیت پروبیوتیکی باسیلوس سابتیلیس از افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی مناسب‌تری که در تیمارها نسبت به شاهد به‌دست آمد به اثبات می‌رسد. نتایج ۲۸ روز غذادهی با غذای حاوی باسیلوس سابتیلیس اختلاف معنی‌دار آماری را در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، وضریب تبدیل غذایی بین تیمارها و شاهد نشان داد. تاثیر باسیلوس سابتیلیس در افزایش وزن و درصد بقاء از راه تغذیه‌ای است، بدین‌ترتیب که این باکتری‌ها ترکیبات سمی و غیرتغذیه‌ای جیره را هضم کرده، سپس میزبان می‌تواند همه غذا را جذب کند (Balcazar، ۲۰۰۴). باسیلوس سابتیلیس انواع مختلفی از پروتئاز و سایر انواع آنزیم‌ها را تولید می‌کند که می‌تواند انواع مواد آلی و مواد غذایی را تجزیه نموده و به مواد مغذی قابل جذب تبدیل کند. از طرف دیگر باسیلوس سابتیلیس با تولید مواد آنتی‌باکتریال و رقابت در جذب املاح غذایی و حتی با ازدیاد و تجمع باکتری‌های پاتوژن در دستگاه گوارش لارو جلوگیری می‌کند (Wang و همکاران، ۲۰۰۸). در این تحقیق جیره با سطح $۱۰^{۶}$ سلول در گرم غذا به‌طور معنی‌داری از سایر سطوح باسیلوس در تیمارها و شاهد اثر بخش‌تر بود. اثربخشی پروبیوتیک در سطح مذکور توسط مطالعات متعددی تائید گردید (keysami و همکاران، ۲۰۰۷؛ Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱؛ Meunpol و همکاران، ۲۰۰۳). رشد کند در سطح بالاتر باسیلوس جیره PF4، قبلاً در تحقیق Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۱) تائید گردیده بود که در آن اثر بخشی پروبیوتیکی باسیلوس، وقتی‌که غلظت باسیلوس بالاتر رفت کاهش پیدا کرد. در این‌که چرا غلظت پائین‌تر باکتری اثربخشی بالاتری نشان داد هنوز مشخص نیست و نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد اما رشد کم‌تر در غلظت بالاتر می‌تواند به جنبه‌های محیط‌زیستی آبزی مربوط باشد، زیرا افزایش غلظت باکتری در آب استرس‌زا بوده و میزان تغذیه لارو را کاهش می‌دهد (keysami و همکاران، ۲۰۱۲). بالاترین غلظت در نظر گرفته شده برای این است که معمولاً به‌نظر می‌رسد که غلظت‌های بیش‌تر موثرتر باشد و از طرف دیگر در هنگام کاربرد غذا در آب بخشی از باکتری‌ها در آب حل شده و از دست می‌روند (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۱). این مطالعه نشان داد که به کاربردن دوز مناسب پروبیوتیک به‌منظور جلوگیری از مصرف میزان بالای آن و در نتیجه جلوگیری از افزایش هزینه تولید، بسیار مهم است (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج شمارش باکتری‌ها در لاشه لاروهای کپورمعمولی و آب مخازن پرورش اختلاف

معنی‌داری را بین باکتری‌های تیمارها و شاهد نشان داد. تراکم باکتری‌های گرم منفی در گروه شاهد از گروه‌های تیمار بالاتر بود، این شاید بدین‌دلیل باشد که باسیلوس سابتیلیس به‌مقدار زیادی مواد آنتی‌باکتریال و ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در محیط پرورش خود رهاسازی می‌کند (Sugita و همکاران، ۲۰۰۲؛ Gullian و همکاران، ۲۰۰۴). باسیلوس سابتیلیس تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل دیفی‌سی‌دین و اکسی‌دیفی‌سی‌دین می‌کند که می‌تواند طیف وسیعی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی را از بین ببرد (Gullian و Rodriquez، ۲۰۰۲). باسیلوس سابتیلیس هم‌چنین تولید بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های معمول هم‌چون باکتریوسین می‌کند (Sugita، ۲۰۰۲). بنابراین به‌نظر می‌رسد که باکتری‌های گرم منفی در تیمارها به‌وسیله باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس کشته شده و توسط آن‌ها جایگزین شده باشد (Gullian و Rodriquez، ۲۰۰۲). افزایش تراکم باکتری مورد مطالعه در لاشه لاروها و آب مخازن پرورش تیمار در این تحقیق می‌تواند نشان‌دهنده تجمع و جاگیری باسیلوس سابتیلیس در بدن لاروها و آب مخازن باشد (هاشمی‌پناه و همکاران، ۱۳۹۸). به‌نظر می‌رسد باکتری‌هایی که بتوانند در دستگاه گوارش لاروها غالب شوند و تجمع یابند شاید گزینه خوبی برای حذف باکتری‌های بیماری‌زا از دستگاه گوارش آبزی و شروع فعالیت پروبیوتیکی باشند FAO/WHO، ۲۰۰۴). بنابراین باکتری مورد تحقیق دارای خواص مفید تغذیه‌ای و بهداشتی در افزایش کنترل رشد و عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش لارو کپور معمولی دارد و بنابراین می‌تواند در پرورش این گونه، مورد استفاده قرار گیرد. براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، گونه باکتری باسیلوس سابتیلیس جدا شده از دستگاه گوارش این لارو می‌تواند به عنوان پروبیوتیک در لارو ماهی کپورمعمولی به‌کار رود. بدین‌ترتیب می‌توان این باکتری‌ها را با غلظت 10^6 سلول درگرم غذا، به غذای لارو کپور معمولی با استفاده از روش خیساندن درمحلول باکتری وارد نموده و رشد و درصد بقاء لارو کپورمعمولی را بهبود بخشید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از رساله کارشناسی ارشد واحد آموزش علوم شیلاتی میرزاکوچک‌خان می‌باشد که بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان واحد و سایر دست‌اندرکاران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **احمدمرادی، م.؛ سلطانیان، س.؛ علیشاهی، م.؛ اخلاقی، م. و شهریاری، ع.، ۱۳۹۸.** اثر ریزپوشانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر شاخص‌های رشد، تغذیه و فاکتورهای خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۱، شماره ۲، صفحات ۲۳۱ تا ۲۳۸.

۲. **رحمتی‌اندانی، ح.ر.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰.** افزایش مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با آئروموناس هیدرو فیلا و یرسینیاروکری با استفاده از لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. فصلنامه دامپزشکی ایران. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۵.

۳. **رئیسی، ح.؛ جعفری، و.؛ ضیایی‌نژاد، س. و پاسندی، ع.، ۱۳۹۴.** بررسی تاثیر پروبیوتیک *Bacllus subtilis* و *Bacillus licheniformis* بر تراکم و قابلیت هضم میگوی وانامی. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۷، شماره۲، صفحات ۲۳۱ تا ۲۳۸.

۴. **کلیائی، ز.؛ آبرومند، ع. و ضیایی‌نژاد، س.، ۱۳۹۵.** تاثیر باکتری زیست‌یار *Bacillus subtilis* مستخرج از روده ماهی کپورمعمولی بر عملکرد رشد و بقاء آن. نشریه توسعه آبزی‌پروری. سال ۱۰، شماره ۲، صفحات ۹۹ تا ۱۰۸.

۵. **کریمی، ع.، ۱۳۹۶.** جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش مولدین ماهی کپور نقره‌ای(*Hypophthalmichthys molitrix*) و غربالگری آن به‌عنوان پروبیوتیک. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزاکوچک خان گیلان. ۱۵۲ صفحه.

۶. **مدبری، ع.، ۱۳۹۱.** مقایسه مختلف زیست‌یار حیاتی باکتوسل در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر فاکتورهای رشد و فلور باکتریایی روده . پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۷۶ صفحه.

۷. **هاشمی‌پناه، ا.؛ رفیعی، غ.؛ نیکبخت، ا. و بزرگی، س.، ۱۳۹۸.** تاثیر آرتمیای غنی شده با دو پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس و پدیوکوکوس پنتوساسئوس بر شاخص‌های رشد و بقا و ترکیبات لاشه پست لارو میگوی پا سفید غربی(*Litopenaeus vannamei*) . فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۱، شماره ۱، صفحات ۲۳۹ تا ۲۴۴.

8. **Bagheri, T.; Hedayati, A.A. and Farzanfar, A., 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 Sciences. Vol. 8, No. 1, pp: 43-48.

9. **Bondad-Reantaso, M.G.; Subasinghe, R.; Arthur, J.R.; Ogawa, K.; Chinabut, S. and Adlard, R., 2005.** Disease and health management in Asian aquaculture. Vet Parasitology. Vol. 30, No. 132, pp: 249-272.

10. **FAO/WHO. 2004.** Report of a joint FAO/WHO expert consoltation on evaluation of health and nutritional properties in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.

11. **Felix, N. and Sudharsan, M., 2004.** Effect of glycine betaine, a feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquacult Nutr. Vol. 10, pp: 193-197.

University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x

25. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.; Salminen, S. and Bylund, G., 2001.** Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture. Vol. 198, pp: 229-236.

26. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; BylundG.; Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss)* by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 15, No. 5, pp: 443-452. DOI: 10.1016/s1050-4648(03) 00023-8.

27. **Rengpipat, S.; Phianphak, W.; Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1998.** Effects of a probiotic bacterium on black tigershrimp Penaeus monodon survivaland growth. Aquaculture. Vol. 167, pp: 301-313.

28. **Resende, J.; Silva, V.; Fontes, C.; Souza-Filho, J.; Oliveira, T.; Coelho, C.; Cesar, D. and Diniz, C.G., 2012.** Multidrug-resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System. Microbes and Environments. Vol. 27, No. 4, pp: 449-455. Doi: 10.1264/js me2.me12049. Epub 2012 Sep 5**.**

29. **Sugita, H.; Okano, R.; Suzuki, Y.; Iwai, D.; Mizukami, M.; Akiyama, N. and Matsuura**, **A., 2002.** Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. The Japanese Society of Fisheries Science. Vol. 68, No. 5, pp: 1004-1011.

30. **Verschuere, L.; Rombaut, G.; Huys, G.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. And Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture, Review. Microbiology and molecular biology. Vol. 64, pp: 655-671.

31. **Wang, Y.; Tian, Z.; Yao, J.T. and Li, W., 2008.** Effect of probiotics, Enteroccus faecium, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response, Aquaculture. Vol. 277, No. 3, pp: 203-207. DOI: 10.1016/j. aquaculture.2008.03.007

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

12. **Gullian, M. and Rodriguez. J., 2002.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory qualities of probiotic bacteria. Global Aquacult, Advocate. Vol. 5, pp: 52-54.

13. **Gullian, M.; Thompson, F. and Rodriguez, J., 2004.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect *in Penaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 233, pp:1-14.

14. **He, S.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Cao, Y.; Meng, K.; Shi, P.; Yao, B. and Ringo, E., 2010**. Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). Archives of Microbiology, 2010 Dec. Vol. 192, No. 12, pp: 985-994. doi: 10.1007/s00203-010-0627-z. Epub 2010 Sep 16.

15. **He, S.; Zhou, Z.; Meng, K.; Zhao, H.; Yao, B.; Ringø, E. and Yoon, I., 2011.** Effects of dietary antibiotic growth promoter and saccharomyces cerevisiae fermentation product on production, Intestinal bacterial community, and nonspecific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* female X *Oreochromis aureus* male). Journal of Animal, 2011 Jan, Vol.89, No. 1, pp: 84-92. Doi: 10.2527/jas.2010-3032. Epub 2010 Sep 17.

16. **He, S.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Cao, Y.; Meng, K.; Shi, P.; Yao, B. and Ringø, E., 2012.** Do dietary betaine and the antibiotic florfenicol influence the intestinal autochthonous bacterial community in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂)? World Journal Microbiol Biotechnol. 2012 Mar. Vol. 28, No. 3, pp: 785-791. doi: 10.1007/s11274-011-0871-7. Epub**.**

17. **Jafarian, H., 2007.** The influence of probiotic bacillus on the feeding efficiency and nutrient composition of body in beluga international workshop on fish larviculture. Urmia University. Iran. 12-14 March 2007.135 p.

18. **Keysami, M.A.; Saad, C.R.; Daud, H.M.; Sijam, K. and Alimon, A.R., 2007.** Effect of *Bacillus subtilis* on larval growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Journal of Aquaculture Nutrition. Vol. 13, pp: 131-136.

19. **Keysami, M.A.; Mohammadpour, M. and Saad, C.R., 2012.** Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. Journal of Aquaculture International. Disease and health management in Asian aquaculture. Vol. 20, pp: 499-511.

20. **Keysami, M.A. and Mohammadpour, M., 2012.** Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila* infection resistance in juvenile fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Jounal of Aquaculture. International. DOI 10, 1007/s10499-012- 9588-3.8.

21. **Merrifield, D.L.; Dimitroglou, A.; Bradley, G.; Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2010.** Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquaculture nutrition. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x

22. **Meunpol, O.; Lopinyosiri, K. and Menasveta, P., 2003.** The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. Vol. 220, pp: 437-448.

23. **Moriarty, D.J.W., 1998.** Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. Vol. 164, pp: 351-358.

24. **Nayak, S.K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. Laboratory of Fish Pathology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresorece Sciences, Nihon