اثر پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس (سویه PTCC 1403) در جیره غذایی، بر شاخص‌های رشد و درصد بازماندگی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در برابر با کتری لاکتوکوکوس گارویه‌آ

- **جواد قاسم‌زاده***: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- **ظهیر شکوه‌سلجوقی**: گروه شیلات،دانشکده منابع‌طبیعی،دانشگاه صنعتی اصفهان،اصفهان،ایران،صندوق‌پستی: ٨٤١٥٦-٨٣١١١
- **پریا اکبری**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- **مهدی حسنی**: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: دی ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: فروردین ١٣٩٧

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوکوکوس‌لاکتیس (PTCC١٤٠٣) در جیره غذایی، بر عملکرد رشد و درصد بازماندگی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus* L.) در برابر باکتری لاکتوکوکوس گارویه آ به‌مدت ٣٠ روز انجام گرفت. در این مطالعه، تعداد ٤٥٠ قطعه ماهی کفال خاکستری با میانگین وزنی ١/٤±٨/٤٤ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی به ٥ تیمار آزمایشی و ٣ تکرار (با تعداد ٣٠ عدد در هر تکرار) دسته‌بندی شدند. تیمارها عبارت بودند از دو تیمار آزمایشی شاهد (بدون استفاده پروبیوتیک) و تیمارهای آزمایشی D٢,D١ وD٣ که به‌ترتیب حاوی ١٠٨×٥/ ١، ١٠٨× ٣ و ١٠٨ × ٦ واحد تشکیل کلنی پروبیوتیک بر گرم غذا بود. بعد از ٣٠ روز، ١٠ عدد بچه ماهی از هر تکرار با باکتری لاکتوکوکوس گارویه آ (تراکم ١٠٧ × ١ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به‌روش غوطه وری) چالش داده شدند و تلفات به‌صورت روزانه تا ١٠ روز پس از چالش ماهیان ثبت شد. نتایج نشان داد که تمامی شاخص‌های رشد و هم‌چنین درصد بازماندگی در تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک بهبود یافت اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان ندادند (P>٠/٠٥)، ولی فاکتور وضعیت (CF) در تیمارهای D٢ و D٣ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<٠/٠٥). درصد بازماندگی از ٤٠ درصد در گروه شاهد به ٦٤درصد در تیمار D٣ و ٦٨درصد در تیمارD٢ افزایش یافت (P<٠/٠٥). به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از سویه (PTCC١٤٠٣) لاکتوکوکوس لاکتیس در جیره غذایی می‌تواند منجر به افزایش ماندگاری بچه ماهی کفال خاکستری در چالش با باکتری لاکتوکوکوس گارویه‌آ شود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوکوکوس لاکتیس، شاخص‌های رشد، کفال خاکستری، لاکتوکوکوس گارویه‌آ

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ghasemzadeh@cmu.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های آبزیان در سراسر جهان همواره باعث کاهش روند تولید شده است و اساسی‌ترین و جدی‌ترین تهدید برای مزارع پرورش ماهی و میگو محسوب می‌شود، به‌طوری‌که در سال‌های اخیر پیشرفت این صنعت را با مشکلات اساسی روبه‌رو کرده است و ارزش اقتصادی آن در کشورهای مختلف به‌خصوص کشورهای درحال‌توسعه ازجمله ایران را با کاهش زیادی روبه‌رو کرده است. بیماری‌های آبزیان به‌دلیل شرایط زیست جاندار در محیط آبی، دیر تشخیص داده می‌شود و غالباً در شرایط پرورشی به‌دلیل تراکم بالا و احتمال سرایت و شیوع سریع‌تر بیماری‌ها با تلفات سنگین و اجتناب‌ناپذیری همراه است، به‌همین دلیل راهکارهای پیشگیری از بیماری‌ها را باید مد نظر قرارداد (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳). همواره راه‌حل‌هایی نیز برای حل این مشکلات ارائه شده است که موفقیت چندانی نداشته‌اند ازجمله در بحث کنترل بیماری‌ها، استفاده از داروهای ضدمیکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) مطرح گردید که پس از سال‌ها خود این داروها مشکلات عدیده‌ای ازجمله مقاوم شدن پاتوژن‌ها، مسائل زیست‌محیطی و ... را به‌وجود آوردند به‌طوری‌که امروزه در اغلب کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممنوع یا با محدودیت‌های شدیدی مواجه است (مطلبی و همکاران، ۱۳۸۹). به‌طورکلی با توجه به محدودیت‌هایی که در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و محرک‌های رشد به‌منظوره کنترل بیماری‌ها و افزایش رشد و تولید در آبزی‌پروری وجود داشت باعث شد تا توجه ویژه‌ای به پروبیوتیک‌ها شود. پروبیوتیک‌ها به‌طورمعمول شامل باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های میکروسکوپی هستند که یا با تغییر فلور میکروبی روده و یا با تغییر شرایط محیط آبی باعث کاهش بیماری و افزایش رشد می‌شوند (Fuller، ۱۹۹۲). Gatesoupe (۱۹۹۹) نیز تعریفی دیگر از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری ارائه نمود: سلول‌های تک یاخته‌ای که از طریق ورود به لوله گوارشی میزبان و قابلیت زنده ماندن، و باهدف بهبود سلامتی مورداستفاده قرار می‌گیرند. این تعریف بر مصارف خوراکی پروبیوتیک و قابلیت آن در بهبود سلامتی میزبان به جهت حضور در لوله گوارش تأکید دارد و از جامع‌ترین تعاریف پروبیوتیک‌ها در رابطه با آبزی‌پروری می‌باشد. در آبزی‌پروری برای اولین‌بار Yasuda و Taga (۱۹۸۰) پیش‌بینی کردند که باکتری‌هایی یافت خواهند شد که‌نه‌تنهابه‌عنوان‌غذا بلکه به‌عنوان کنترل‌کننده‌های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال‌کننده‌های چرخه مواد غذایی مفید می‌باشند. هرچند مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها به‌صورت واضح مشخص نیست اما پروبیوتیک‌ها از طریق تولید باکتریوسین‌ها یا رقابت برای موادمغذی و یا جایگاه‌های اتصال، تغییر متابولیسم باکتری‌ها، سبب تحریک سیستم ایمنی بدن میزبان(ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی)می‌شوند که مانع از تشکیل کلونی پاتوژن‌ها در لوله گوارش میزبان می‌شوند؛ هم‌چنین پروبیوتیک‌ها از طریق تولید ویتامین‌ها، ترکیبات مسمومیت‌زدا در جیره و تجزیه ذرات غیرقابل‌هضم سبب تحریک اشتها و بهبود تغذیه میزبان می‌شوند که در نهایت می‌تواند منجر به افزایش رشد و تولید بیش‌تر در آبزی‌پروری شود (Kaoort، ۲۰۰۴). گزارش‌های متعددی در زمینه استفاده از سویه‌های مختلف باکتری به‌عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهیان و میگو صورت گرفته ازجمله می‌توان به اثر سویه کارنوباکتریوم K1بر مقاومت علیه عوامل بیماری‌زای ویبرو انگوئیلاریوم (*Vibrio anguillarium*) و آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonocidae*) در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Joborn و همکاران، ۱۹۹۷)، سویه باکتری کارنوباکتریوم دایورژنز (*Carnobacterium divergens*) بر علیه آئروموناس سالمونیسیدا در ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) و روغن ماهی آتلانتیک (*Gadus morhua*)(Gildberg و همکاران، ۲۰۰۲)، سویه‌های پروبیوتیکی *Enterbacter amingenus* و انتروباکتر PIC15به‌منظورافزایش مقاومت در بیماری آب سرد در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Burbank و همکاران، ۲۰۱۱)، سویه *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص رشد و ایمنی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Pirarat و همکاران، ۲۰۱۱) و سویه‌های باکتری *Lactococcus lactis* و لاکتیک ۱۲ بر رشد و پاسخ ایمنی ماهی کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) در برابر بیماری *Sterptococcus iniae* (Heo و همکاران، ۲۰۱۳)، و سویه‌های *Bacilus licheniformis* و *B. subtilis* بر رشدماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Mocanu و همکاران، ۲۰۱۳) را نام برد. عفونت‌های استرپتوکوکی گرچه در ماهیان معمول نیست، ولی در صورت وقوع بیماری می‌توانند خسارت‌های جبران‌ناپذیری را وارد نمایند (Vendrell و همکاران، ۲۰۰۶) . درجنس استرپتوکوکوس چندین باکتری دیگر وجود دارند که بیماری‌های مشابهی ایجاد می‌کنند مثل لاکتوکوکوس (*Lactococcus*)، انتروکوکوس (*Enterococcus*) و واگوکوکوس (*Vagococcus*) که بیماری‌های حاصل از آن‌ها مجموعاًاسترپتوکوکوزیس می‌نامند (Vendrell و همکاران، ۲۰۰۶، Doménech و همکاران، ۱۹۹۳، Elder و Ghittino، ۱۹۹۹). سپتی‌سمی استرپتوکوکال در میگوی آب‌شیرین (*Macrobrachium rosenbergi*)(Chen و همکاران، ۲۰۰۱) و ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)(Chen و

همکاران، ۲۰۰۲) گزارش شده است. استفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران دانست که به‌صورت زیستی و طبیعی علاوه بر کنترل بیماری‌های آبزیان، باعث افزایش رشد و تولید در واحد سطح، و کاهش هزینه‌های جانبی در این صنعت می‌شود. این موضوع دیر زمانی است که در کشورهای توسعه‌یافته و تولیدکننده آبزیان مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته است. به‌طورکلی می‌توان تحقیقات انجام‌گرفته در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها را در ۲ هدف اساسی خلاصه کرد: ۱- افزایش رشد و تولید در آبزی‌پروری ۲- کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در آبزیان. از طرف دیگر با توجه به رشد روزافزون صنعت آبزی‌پروری در کشور، نیاز به این نوع پژوهش‌ها در کشور احساس می‌شود (Ali، ۲۰۰۲، Kaoort، ۲۰۰۴). با توجه به این‌که اطلاعات محدودی در ارتباط با سویه‌های مختلف پروبیوتیک و هم‌چنین سویه مورد استفاده در تحقیق حاضر (لاکتوکوکوس لاکتیس Lactococcus lactis subsp. PTCC 1403) و کاربرد آن در جیره غذایی موجودات زنده به‌خصوص آبزیان آب شور و گونه کفال خاکستری در دسترس است، لذا این تحقیق با هدف بررسی تأثیر این سویه (لاکتوکوکوس لاکتیس) بر عملکرد رشد و بازماندگی ماهی کفال خاکستری در مواجهه و چالش علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویهآ طرح و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش: این پژوهش در دی‌ماه ۱۳۹۴ در کارگاه پرورش ماهی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شد. ۴۵۰ عدد بچه ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) از مزرعه تکثیر میگوی مدنی واقع در کنارک خریداری و با وانت مجهز به مخزن فایبرگلاس متصل به سیستم هوادهی به محل اجرای آزمایش، انتقال داده شد. پس از طی مرحله سازگاری به‌مدت یک هفته و اطمینان از سلامتی آن‌ها، بچه‌ماهی‌ها با میانگین وزنی ۱/۴۰±۸/۴۴ گرم شمارش شده و با تراکم ۳۰ عدد به ۱۵ آکواریوم‌های شیشه‌ای ۶۰ لیتری منتقل شدند. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۰/۵±۲/ ۲۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۸۷±۷/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب معادل ۰/۴±۷/۸ بود، و در طی دوره آزمایش دوره نوری به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. به‌منظور هوادهی و تامین نیاز اکسیژن ماهی‌ها، هر یک ازمخزن ها به یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود مجهز گردید. در تحقیق حاضر دوتیمار شاهد تنها با غذای تجاری تهیه شده از شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء شیراز (با قطر ۲ میلی‌متر، ۳۴ درصد پروتئین خام، ۴/۲ درصد چربی خام و ۷/۷۷ درصد خاکستر) تغذیه شد، و ۳ تیمار D۳،D۲، D۱ نیز با همین غذای مکمل شده با سطوح۱۰۸×۱/۵/ ۱، ۱۰۸× ۳و ۱۰۸×۶ واحد تشکیل کلنی پروبیوتیک بر گرم غذا تغذیه گردیدند. همه تیمارها شامل سه تکرار بودند و آزمایش طی یک دوره ۳۰ روزه انجام گردید.

کشت باکتری پروبیوتیک و اضافه کردن آن به جیره آزمایشی: برای تهیه جیره آزمایشی با تراکم باکتریای مورد نظر ابتدا باکتری پروبیوتیک (لاکتوکوکوس لاکتیس PTCC 1403) از مرکز کلکسیون‌قارچ‌هاو باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه شد. پس از خارج کردن باکتری از حالت لیوفیلیزه، در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتر در محیط کشت مایع (نوترینت براث) کشت داده شد. در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در مدت چهار ساعت انکوباسیون به غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند رسید، سپس این ۱۰ میلی‌لیتر حاوی باکتری پروبیوتیک را در شرایط کاملاً استریل، زیر هود و در کنار شعله به ۵۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع که به‌صورت استریل تهیه‌شده بود اضافه گشت. رشد باکتری پروبیوتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب در ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت به‌ترتیب به غلظتی معادل با ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلند رسید که حاوی تراکم باکتریایی به‌ترتیب با ۱۰۸×۱/۵، ۱۰۸× ۳ و ۱۰۸×۶ واحد تشکیل کلنی پروبیوتیک بر گرم غذا بود که با استانداردهای مک فارلند تطابق داده شد. محیط‌های کشت حاوی باکتری پروبیوتیک را در فالکن‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ماده شفاف آن در قسمت بالایی قرار گرفت؛ ماده شفاف آن نیز پس از اتوکلاو دور ریخته شد و باکتری‌های ته‌نشین شده در انتهای فالکن‌ها به ۱۵ میلی‌لیتر روغن ماهی اضافه شد و برای اسپری کردن روی جیره‌های آزمایشی آماده شد (Burbank و همکاران، ۲۰۱۱).

آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان: قبل از اضافه کردن باکتری پروبیوتیک به جیره‌های آزمایشی، غذاهای گرانوله برای کاهش بار باکتریایی به‌مدت ۴۵ دقیقه در معرض اشعه ماوراء بنفش (UV) قرار گرفت در مرحله آخر ۱۵ میلی‌لیتر روغن ماهی حاوی غلظت‌های باکتری پروبیوتیک در این تحقیق بر روی جیره غذایی اسپری شد. هم‌چنین برای تهیه جیره آزمایشی برای گروه شاهد (کنترل) فقط روغن ماهی (۱۵ میلی‌لیتر) بدون افزودنی پروبیوتیکی اضافه شد. پس از خشک شدن، جیره‌های آزمایشی را در یخچال و دمای ۴ درجه

سانتی‌گراد نگه‌داری نموده و به‌منظور تغذیه ماهیان استفاده گردید (Burbank و همکاران،۲۰۱۱).مقدار غذای روزانه با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در نوبت صبح و عصر به‌میزان ۳٪ وزن بدن در اختیار بچه ماهیان قرار گرفت. عمل سیفون کردن، یک‌روز در میان‌انجام و باقی‌مانده غذایی و مدفوع ماهی ها از مخازن خارج گردید.

زیست‌سنجی‌وبررسی‌فراسنجه‌های رشد و تغذیه: به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشد،درانتهای آزمایش تمام ماهی‌ها هر مخزن خارج شده و وزن (با دقت ۰/۰۱ گرم) و طول (با دقت ۱ میلی‌متر) آن‌ها ثبت گردید. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی‌ها، در بررسی پارامترهای رشد، معیارهایی مانند، افزایش وزن بدن (Weight gain=WG)،میانگین رشد روزانه (ADG=DailyGrowth coefficient)، نرخ رشد ویژه (SGR= Specific Growth Rate)، ضریب تبدیل غذایی (FCR= Food Conversion Rate)، کارایی تبدیل غذا (FCE= Food Conversion Efficiency)، فاکتور وضعیت(CF=Condition Factor) ، نسبت کارایی پروتئین (PER=Protein EfficiencyRate)،نسبت کارایی چربی (LER= Lipid Efficiency Rate) و درصد بازماندگی (SVR= Survival Rate) محاسبه شدند (Heo و همکاران، ۲۰۱۳):

$$WG\ (\%) = [(W2 - W1)\ /W\ 1] \times ۱۰۰$$

W1: وزن نهایی ماهی (گرم)، W2: وزن اولیه ماهی (گرم)

$$ADG\ (\%) = [Wt2–Wt1/Wt1\times(t2–t1)]\times 100$$

Wt2: وزن نهایی ماهی (گرم)،Wt1: وزن اولیه ماهی (گرم)، (t2–t1): طول دوره آزمایش (روز)

$$SGR\ (\%) = [LnWt2–LnWt1\ /\ t2–t1]\times 100$$

LnWt2: لگاریتم وزن متوسط نهایی ماهی(گرم)،LnWt1: لگاریتم وزن متوسط اولیه ماهی(گرم)، t2–t1: طول دوره آزمایش (روز)

*FCR= g dry feed eaten/g live weight gain

g dry feed eaten: غذای خورده شده(گرم)، g live weight gain: وزن به‌دست آمده (گرم)

$$*FCE\ (\%) = [g\ live\ weight\ gain/g\ Dry\ feed\ eaten]\times 100$$

g live weight gain: وزن به‌دست‌آمده ماهی(گرم)، Dry feed eaten g: مقدار غذای خشک خورده شده (گرم)

$$*CF= [W/\ L\ 3\ ] \times 100$$

W:متوسط وزن‌نهایی‌ماهی(گرم)، L متوسط طول کل ماهی (سانتی‌متر)

کشت عامل بیماری‌زا لاکتوکوکوس گارویه‌آ: جهت آماده‌سازی لاکتوکوکوس گارویه‌آ(EU727199) ازایزوله باکتری لیوفیلیزه استفاده شد. ایزوله مذکور قبلاً از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به بیماری لاکتوکوکوزیز جداسازی و شناسایی گردیده بود (Sharifiyazdi و همکاران، ۲۰۱۰). پس از خارج کردن باکتری از حالت لیوفیلیزه، سویه بر روی پلت‌های آگار خون گوسفند در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت رشد یافت و محیط کشت استوک در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد در آبگوشت تریپتون (Tryptone soy broth) با ۱۵ درصد گلیسرول نگه‌داری شد. سپس از پرگنه‌های رشد یافته سوسپانسیون باکتری با دوزهای ۱۰۸،۱۰۷،۱۰۶ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به‌روش مک فارلند تهیه گردید و از آن‌ها به‌منظور آزمون تعیین میزان LC50 استفاده شد (MacFarland، ۲۰۰۰).

آزمون تست حساسیت سویه بیماری‌زا، تعیین میزان LC50: در روز سی‌ام پس از اتمام دوره و قطع غذا به‌مدت ۴۸ ساعت، به‌منظور تعیین LC50 که مرگ و میر نصف ماهیان طی مدت ۹۶ ساعت بود، این آزمون انجام شد (احمدی و همکاران،۱۳۹۰). در این آزمایش هر کدام از غلظت‌های (۱۰۸،۱۰۷،۱۰۶ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) در ۲ تکرار و در هریک از تکرارها تعداد ۲۵ بچه ماهی قرار داشت. ماهیان پس از چالش ۱ دقیقه‌ای به‌روش غوطه‌وری با عامل بیماری‌زا به مخزن‌های اصلی نگه‌داری انتقال داده شدند و نتایج آن طی مدت ۹۶ ساعت بررسی شد (Hosseini و همکاران، ۲۰۱۱؛ احمدی و همکاران،۱۳۹۰).

چالش ماهیان با عامل بیماری‌زای لاکتوکوس گارویه‌آ: پس از تعیین LC50، ۴۸ ساعت قبل از چالش ماهیان با عامل بیماری‌زا، غذادهی قطع شد (Burbank و همکاران، ۲۰۱۱؛ Choi و همکاران، ۲۰۱۴). ۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار را به‌مدت ۱ دقیقه به‌روش غوطه‌وری با عامل بیماری‌زا (۱۰۷واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر، LC50) چالش داده و به آکواریوم‌های شیشه‌ای ۶۰ لیتری خود برگردانده شدند. از دو گروه شاهد به‌عنوان شاخص سلامت و پایداری محیط، تعدادی ماهی (۱۰ قطعه ماهی در هر تکرار) در معرض عامل بیماری‌زا قرار داده نشد و گروه دیگر شاهد (۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار) را با عامل بیماری‌زا چالش داده و میزان مرگ‌ومیر روزانه تا پایان روز دهم ثبت شد. درصد بازماندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

SVR(%) = درصد بازماندگی

۱۰۰× [تعداد ماهیان مورد آزمایش / تعداد ماهیان مورد آزمایش - تعدادتلفات]

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و درصد بازماندگی، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف سنجیده شد سپس با استفاده از آنالیز

واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه چنددامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵٪ بین تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای تجزیه وتحلیل داده‌هاازنرم‌افزار SPSS 16 درمحیط ویندوز XPاستفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های رشد، بقاء و تغذیه: نتایج مربوط به شاخص‌های رشد، بقاء و تغذیه در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به جیره‌های غذایی تفاوت معنی‌داری را در شاخص‌های رشد بقاء و تغذیه به‌استثنای فاکتور وضعیت نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). در بین تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک بین تیمارهای D۱ و D۳ در شاخص‌های، افزایش وزن (WG)، میانگین رشد روزانه (ADG)، نسبت کارایی پروتئین (PER)، و نسبت کارایی چربی (LER) باهم اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵).

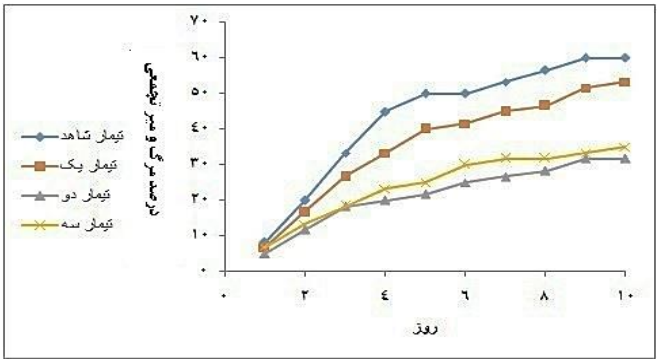
جدول ۱: مقایسه میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص‌های رشد، بقاء و تغذیه در تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش

شاخص‌ها / تیمار	شاهد (غذای تجاری مکمل نشده با پروبیوتیک)	D_1 (غذای تجاری مکمل شده با ۱/۵×۱۰^{۸}واحدتشکیل کلنی‌برگرم)	D_2(غذای تجاری مکمل شده با ۳×۱۰^{۸}واحد تشکیل کلنی‌برگرم)	D_3(غذای تجاری مکمل شده با ۶×۱۰۸واحد تشکیل کلنی‌برگرم)
افزایش رشد (WG)	۴۰/۲۰±۰/۴۵^{ab}	۳۶/۹۴±۰/۴۱^{b}	۴۸/۳۸±۰/۳۳^{a}	۵۱/۴۴±۰/۴۸^{a}
میانگین رشد روزانه (ADG)	۰/۱۳±۰/۰۱^{ab}	۰/۱۲±۰/۰۱^{b}	۰/۱۶±۰/۰۱^{a}	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	۱/۷۳±۰/۰۲^{a}	۱/۷±۰/۰۸^{a}	۱/۶۸±۰/۰۱^{a}	۱/۶۹±۰/۰۱^{a}
ضریب ویژه رشد (SGR)	۱/۴۸±۰/۱۵^{a}	۱/۴۱±۰/۲۱^{a}	۱/۶±۰/۱۹^{a}	۱/۸۲±۰/۱۷^{a}
فاکتور وضعیت (CF)	۰/۴۸±۰/۰۲^{b}	۰/۴۹±۰/۰۱^{b}	۰/۵۴±۰/۰۱^{a}	۰/۵۶±۰/۰۱^{a}
کارایی تغذیه (FCE)	۱۱/۹۴±۱/۳۴^{a}	۱۰/۳۶±۱/۱۹^{a}	۱۲/۶۲±۰/۸۶^{a}	۱۳/۷۸±۱/۳^{a}
نسبت کارایی پروتئین (PER)	۰/۵۹±۰/۰۳^{ab}	۰/۵۷±۰/۰۲^{b}	۰/۶۶±۰/۰۱^{ab}	۰/۶۸±۰/۰۱^{a}
نسبت کارایی چربی (LER)	۰/۴۶±۰/۰۲^{ab}	۰/۴۴±۰/۰۳^{b}	۰/۴۹±۰/۰۲^{ab}	۰/۵۸±۰/۰۴^{a}
بقاء (درصد)	±۸۵ ۰^{a}	±۹۱ ۰^{a}	±۹۵ ۰^{a}	۰±۹۳ ^{a}

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

تعیین LC50: نتایج حاصل از تعیین LC50 نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۶،۱۰۷،۱۰۸واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی میزان مرگ و میر طی مدت ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۰/۳۴±۱۰، ۰/۸۹±۵۵ و۴/۲۳± ۸۵ درصد بود. لذا مرگ و میر نصف ماهیان (LC50) طی مدت ۹۶ ساعت در غلظت ۱۰۷ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

درصد مرگ و میر تجمعی پس از چالش ماهیان: درصد مرگ و میر تجمعی ماهیان در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک و هم‌چنین یکی از گروه شاهد پس از چالش، با باکتری لاکتوکوکوس گارویه‌آ (۱۰۷ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) در شکل۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان مرگ و میر در گروه شاهد مشاهده شد ولی تیمار یک حاوی ۱/۵×۱۰۸ واحد تشکیل کلنی بر گرم غذا با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). درحالی‌که کم‌ترین درصد مرگ و میر تجمعی در تیمار دو حاوی ۳×۱۰۸ واحد تشکیل کلنی بر گرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۳ حاوی ۶×۱۰۸ واحد تشکیل کلنی بر گرم غذا نشان‌نداد ولی اختلاف معنی‌داری را تیمار دو و سه در مقایسه با شاهد و تیمار یک نشان دادند (P<۰/۰۵).



شکل ۱: درصد مرگ و میر تجمعی ماهیان کفال خاکستری در تیمارهای مختلف به‌مدت ده روز پس از چالش، با باکتری لاکتوکوکوس گارویه‌آ (۱۰۷ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر)

بحث

تغییرات شاخص‌های رشد و تغذیه در بین تیمارهای مختلف در این تحقیق، نشان‌داد که در پایان‌دوره آزمایش، اضافه‌نمودن غلظت‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به جیره غذایی تفاوت معنی‌داری را در شاخص‌های رشد، تغذیه و بقاء به‌استثنای فاکتور وضعیت ایجاد نکرد، هرچند از نظر عددی بیش‌ترین شاخص‌های رشد در تیمار حاوی ۱۰۸ × ۶ واحد تشکیل کلنی پروبیوتیک بر گرم غذا مشاهده شد. در بررسی که توسط Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت مشخص شد که استفاده از پروبیوتیک *Pedicoccus acidlactici* در جیره ماهی تیلاپیای قرمز (*Oreochromis niloticus*) اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و ضریب کارایی پروتئین ایجاد نکرده است هم‌چنین McIntosh و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک تجاری Biostart HB-1 و HB-2 (که حاوی مخلوطی از سویه‌های *B. Subtilis* *B. megaterium* , *B. polymyxa*, *B. lecchiniformis* می‌باشد) به آب محیط پرورشی میگوی وانامی (*Peneaus vanamei*) تأثیر معنی‌داری بر بازماندگی، وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، کیفیت آب و رسوبات نداشت که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشتند. تحقیق صورت گرفته توسط Pirarat و همکاران (۲۰۱۱) نیز نتایج به‌دست آمده از این تحقیق را تایید می‌کند. آن‌ها با بررسی اثر سویه *Lactobacillus rhamnosus* GG بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticos*) در طی مدت ۳۰ روز نشان دادند که شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی (FCR) ضریب رشد ویژه (SGR) و افزایش وزن (WG)، درگروه دریافت‌کننده پروبیوتیک بهبود یافت اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد حاصل نشد. Heo و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که استفاده از سویه لاکتوکوکوس لاکتیس (L.I2) اثر مثبتی بر بهبود شاخص‌های رشد ازجمله افزایش وزن (WG)، کارایی تغذیه (FCE)، ضریب رشد ویژه (SGR) و کارایی پروتئین (PER) در ماهی کفشک زیتونی داشت اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد، ولی در شاخص فاکتور وضعیت (CF)، این اختلاف معنی‌دار بود، درصورتی‌که مدبری و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک باکتوسل به‌جیره‌غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌طور معنی‌داری موجب افزایش فاکتورهای مختلف رشد و بهبود شرایط تغذیه‌ای ازجمله ضریب تبدیل غذایی شد، اما درصد بقاء در بین ماهیان اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. هم‌چنین افزودن پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی به جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه شد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲) که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی نداشت. از دلایل تفاوت این مطالعه، با مطالعه حاضر می‌توان به نوع پروبیوتیک مصرف شده، گونه میزبان، سیستم گوارشی متفاوت و در نتیجه تفاوت در باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش نسبت داد. بررسی مستقیم تاثیر پروبیوتیک در مطالعات کار دشواری است زیرا کاربرد پروبیوتیک به بسیاری از فاکتورها مانند ترکیب گونه، سطوح استفاده، تناوب استفاده‌و شرایط محیطی بستگی دارد (Gomze-Gil و همکاران، ۲۰۰۰). در بررسی حاضر مقدار فاکتور وضعیت در تیمارهای حاوی ۱۰۸×۳ و ۱۰۸×۶ واحد تشکیل کلنی بر گرم غذا افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱۰۸×۱/۵ واحد تشکیل کلنی بر گرم غذا نشان‌دادند. نتایج به‌دست آمده در مکزیک درخصوص شاخص وضعیت که تاثیر باکتوسل ولووسل را مورد مقایسه قرار دادند که باکتوسل باعث افزایش در شاخص وضعیت گردید ولی در قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد نتایج متفاوتی به‌دست آوردند که بر شاخص وضعیت آن‌ها باکتوسل تاثیری ندارد (Efsa، ۲۰۰۷). آذری‌تاکامی و همکاران (۱۳۹۱) تاثیر باکتوسل بر شاخص وضعیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاکی از افزایش شاخص وضعیت در ماهی قزل‌آلا بود. علت این تناقضات را تغییر در نوع مکان و ماهی مورد پرورش و تفاوت در دوز مصرفی می‌توان دانست. نتایج تحقیق حاضر درخصوص درصد مرگ و میر تجمعی تا ۱۰ روز بعد از چالش با عامل بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویهآ (*L. gravieae*) نشان داد که در تیمارهای‌دریافت‌کننده‌پروبیوتیک (لاکتوکوس‌لاکتیس PTCC۱۴۰۳) این تلفات کم‌تر بود و درصد بازماندگی در این گروه‌ها نسبت به شاهد بالاتر بود به‌طوری‌که درصد بازماندگی از ۴۰ درصد در گروه شاهد به ۶۴ درصد در تیمار D۳ و ۶۸ درصد در تیمارD۲ ارتقاء یافت و در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$). هرچند تلفات در تیمار D۱ (دریافت‌کننده پروبیوتیک با غلظت پایین) کاهش پیدا کرد اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P>0/05$). استفاده از پروبیوتیک‌های حاوی باکتری اسیدلاکتیک به افزایش میزان زنده‌مانی میزبان در مواجه با عامل بیماری‌زا منجر می‌شود که این عملکرد را می‌توان به‌علت اثر آنتاگونیستی بر ضدعامل بیماری‌زا از طریق ترشح‌مواد باکتری‌کش‌همانندباکتریوسین و محدود کردن عامل بیماری‌زا از طریق افزایش محل اتصال یا استفاده از ماده و انرژی در دسترس و افزایش سد دفاعی از طریق افزایش

سطوح ایمنی در بدن میزبان دانست (Gatsoupe، ۱۹۹۹). باکتری‌های اسیدلاکتیک ازجمله باکتری‌هایی هستند که ترکیباتی همانند باکتریوسین‌هارا تولیدمی‌کنند و بدین‌طریق از رشد میکروارگانیزم‌های دیگر جلوگیری می‌کنند (Vadstein و همکاران، ۱۹۹۳). در گزارش دیگری دلیل این افزایش بقا و درصد بازماندگی را از بین رفتن باکتری‌های مضر به‌وسیله باکتری مفید (کمک‌زیست‌یار) دانست (Lemos و همکاران، ۱۹۹۵). این احتمال وجود دارد که جمعیت‌های میکروبی برخی مواد شیمیایی را می‌توانند آزاد کنند که بر جمعیت‌های میکروبی دیگر آثار ضدمیکروبی داشته باشد و بتوانند روابط بین جمعیتی را از طریق تحت تأثیر قرار دادن و رقابت برای جذب مواد شیمیایی با انرژی موجود تغییر دهند. Macey و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند ماهیانی که سیستم ایمنی آن‌ها توسط پروبیوتیک تقویت شده است بسیار سریع‌تر از ماهیانی که سیستم ایمنی آن‌ها تقویت نشده است، قادر به پاسخگویی به استرس محیطی و عوامل بیماری‌زا هستند. در مطالعات Heo و همکاران (۲۰۱۳)، اثر سویه لاکتوکوکوس لاکتیس (L.I2) بر پارامترهای ایمنی و هم‌چنین درصد بازماندگی در چالش عامل بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیائی (S.iniae) در ماهی کفشک دریایی، را بررسی کردند. نتایج مربوط به درصد بازماندگی و کاهش مرگ و میر قابل ملاحظه بود به صورتی‌که در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک (L.I2) پس از ۹ روز چالش با عامل بیماری‌زا ۱۰۰ درصد بازماندگی داشت، درصورتی‌که گروه شاهد تنها ۱۰ درصد بازماندگی و ۹۰ درصد نرخ مرگ‌ومیر از خود نشان داد، که این اختلاف با گروه‌شاهدمعنی‌دار بودتاجایی‌که پیشنهاد شد جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق با تحقیق حاضر مطابقت داشت. درخصوص کنترل لاکتوکوکوزیز در ماهی‌قزل‌آلای‌رنگین‌کمان توسط یزدان‌پناه‌گوهرریزی(۱۳۸۹)گزارشی ارائه شده است. در این گزارش اثرات هم‌آوری سویه‌های پروبیوتیک (سویه‌های *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactobacillus plantarum*) را بر روی کنترل لاکتوکوکوزیز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفته شد. نتایج ارزیابی نهایی نشان‌دهنده کاهش مرگ و میر ماهی‌ها به‌طور معنی‌داری از ۷۸درصد درگروه شاهد به ۴۶ تا۵۴ درصد در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک گردید، که با نتایج تحقیق حاضرمطابقت‌داشت. Barbank و همکاران (۲۰۱۱)، با بررسی استفاده از سویه‌های پروبیوتیکی *Entrobacter amingenus* و سویه *Entrobacter* PIC15 به‌منظور افزایش مقاومت در برابر باکتری*psychrophilum* *Flavobacterium* در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک، پس از چالش با عامل بیماری‌زای *F. psychrophilum* کاهش مرگ‌ومیر نسبت به‌گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نیز با تحقیق حاضر مطابقت داشت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تمامی‌شاخص‌های رشد بررسی‌شده در دو تیمار دریافت‌کننده پروبیوتیک سویه لاکتوکوکوس لاکتیس (PTCC۱۴۰۳) (D۲ و D۳) نسبت به گروه شاهد بهبود یافت اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان ندادند. تنها این اختلاف در شاخص فاکتور وضعیت (CF) در تیمارهای D۲ و D۳ با گروه شاهد معنی‌دار بود. هم‌چنین درصد تلفات تجمعی در چالش با عامل بیماری‌زای لاکتوکوس گاویهآ در تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک (سویه لاکتوکوکوس لاکتیس PTCC۱۴۰۳) (D۲ و D۳) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد به‌طوری‌که درصد بازماندگی از ۴۰ درصد در گروه شاهد به ۶۴ درصد در تیمار D۳ و ۶۸ درصد در تیمار D۲ افزایش یافت، هرچند تلفات در تیمار D۱ (دریافت‌کننده پروبیوتیک با غلظت پائین) کاهش پیدا کرد اما اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. به‌طورکلی می‌توان به این‌نتیجه‌رسید که استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس (PTCC 1403)، درجیره غذایی به‌منظور افزایش ماندگاری ماهیان کفال خاکستری در چالش با عامل بیماریزای لاکتوکوکوس گارویهآ می‌تواند پشنهاد گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار در انجام این تحقیق و هم‌چنین از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **احمدی،ک.؛ میرواقفی،ع.؛ بنایی، م. و موسوی، م.، ۱۳۹۰.** مطالعه فاکتورهای خونی و آسیب‌شناسی بافتی ناشی از آئرومونواس هیدروفیلا در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه شیلات مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۲۴، صفحات ۲۱۷تا ۲۲۷.

۲. **حسینی‌فر،ح. و پورامینی،م.، ۱۳۸۶.** کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. انتشارات موج سبز. ۱۵۰ صفحه.

۳. **حسینی، ا.؛ بذرگر، ل.؛ دیانت‌پور، و. و بذرگر، س.، ۱۳۹۲.** اثر

اقتصادی پروبیوتیک باکتوسل در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. تحقیقات اقتصاد کشاورزی. دوره ۵، شماره ۳، صفحات ۱۵۷ تا ۱۶۸.

۴. **قشقایی،ر. و لایق، م.، ۱۳۸۳.** پروبیوتیک‌ها (تکنولوژی نوین در آبزی پروری). انتشارات نقش مهر. ۱۳۰صفحه.

۵. **مدبری، ع.؛ آذری‌تاکامی، ق.؛ بهمنش، ش. و خارا، ح.، ۱۳۹۲.** تاثیر مقادیر مختلف زیست بارهای باکتوسل در جیره غذایی قزل بر فاکتورهای رشد و فلو باکتریایی. نشریه توسعه آبزی‌پروری. دوره۷، شماره ۴، صفحات ۸۰ تا ۸۴.

۶. **مطلبی، ع.؛ صفری،ر. و غرقی، ا.، ۱۳۸۹.** پروبیوتیک‌ها و کاربرد آن‌ها در آبزی‌پروری. مجموعه مقالات اولین همایش پروبیوتیک و محصولات فرآویزه. شماره ۳، صفحات ۶۶ تا ۷۸.

۷. **یزدان‌پناه‌گوهرریزی، ل.، ۱۳۸۹.** نقش باکتری‌های پروبیوتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جلوگیری از لاکتوکوکوزیز. مجموعه مقالات اولین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فراویژه. شماره ۳، صفحات۳۵۴ تا ۳۵۵.

۸. **Ali, A., 2002.** Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture PhD Thesis. University of Agricultural Sciences. Sweden.

۹. **Burbank, D.R.; Shah, D.H.; LaPatra, S.E. and Fornshell, K.D., 2011**. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout. Aquaculture. Vol. 321, pp:185-190.

۱۰. **Chen, S.; Suhko, S.; Wu, C.; Chaung, H.; Tasai, Y.; Yang, K.; Chen, Y.; Chen, T.; Lin, G.; Cheng, S.; Lin, Y.; Lee, J.; Lai, C.; Weng, Y. and Chu, Y., 2002.** *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet (*Mugil cephalus* L.), in Taiwan. Journal of fish Diseases. Vol. 12, pp: 727-732.

۱۱. **Choi, W.; Lam, C.L.; Mo, W.Y.; Cheng, Z.; Mak, N.K.; Bian, Z.X. and Wong, M.H., 2014**. Effect of the modified Hunglian Jiedu decotion on the resistance in grey mullet (*Mugil cephalus L.*) to *Lactococcus garvieae*. Marine pollution Bulletin. Vol. 85, pp: 816-823.

۱۲. **Doménech, A.; Prieta, J.; Fernández-Garayzábal, J.F.; Collins, M.D.; Jones, D. and Dominguez, L., 1993**. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. Journal of Microbiology. Vol. 9, pp: 63-68.

۱۳. **EFSA (European Food Safety Authority). 2008.** Technical guidance prepared by the Panel Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance.http://www.efsa.eu.int/cs/BlobServer/Scientific Opinion/feedapopej732tgantimicrobialresistanceen.pdf .

۱۴. **Elder, A. and Ghittino, C., 1999**. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* similar, but different diseases. Diseases Aquatic Organisms. Vol. 36, pp: 227-231.

۱۵. **Ferguson, R.M.W.; Merrifield, D.L.; Harper, G.M.; Rawling, M.D.; Mustafa, S.; Picchietti, J. L.; Balcazar, J. l. and Davies, S.J., 2010.** The effect of *pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on growing red tilapia. Journal of Applied Microbiology. Vol. 109, pp: 851-862.

۱۶. **Fuller, R., 1992.** History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics: The Scientific Basis. Champan and Hall, New York. 108 p.

۱۷. **Gatesoupe, A. and Mikkelson, H., 1999.** Effect of supplementing the feed in turbot with lactic acid bacteria and immono-stimulating peptides during a challenge trail with *vibrio angullarium*. Aquaculture. Vol. 167, pp: 103-113.

۱۸. **Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker, E. and Ringo, E., 2002.** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of atlantic cod (*Gadus morhua).* Journal of Hydrobiologia. Vol. 352, pp: 279-285.

۱۹. **Gomez-Gil, B.; Roque, A. and Turnbull, J.F., 2000.** The use of a selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquacul. Vol. 9, pp: 259-270

۲۰. **Heo, W.S.; Kim, Y.; Kim, E.; Bai, S. and Kong, S., 2013**. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. lactis I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder. Aquaculture.Vol. 24, pp: 376-379.

۲۱. **Jobron, A.; Olsson, J.C.; Westerdahl, A.; Conway, P.L. and Kejellberg, S., 1997**.Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substance in intestinal mucus and faecal extract by *carnobacterium sp strain* k_1. Fish diseases. Vol. 20, pp: 383-392.

۲۲. **Kaoort, S.B.; Tucker, J.W.; Thoresen, M. and Sennett, D.G., 2004**. Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae. World Aquaculture Society. Vol. 33, pp: 286-291.

۲۳. **Lemos, M.L.; Dopazo, C.P.; Toranz, A.E. and Barja, L., 1995.** Competitive dominance of antibiotic producing marine bacteria in mixed cultures. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 71, pp: 228-232.

۲۴. **Macey, B.M. and Coyne, V.E., 2005**. Improved growth rate and disease resistance in farmed Haliotismidae through probiotic treatment. Aquaculture. Vol. 245, pp: 249-261.

۲۵. **MacFarland, J.F.,2000.** Biochemical testes for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins. New York.

۲۶. **McIntosh, D.; Samocha, T.M.; Jones, E.R.; Lawrence, A.L.; McKee, D.A.; Horowitz, S. and Horowitz, A., 2000.** The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquacultural Engineering. Vol. 21, pp: 215-227.

۲۷. **Mocanu, M.; Cristea, V.; Dediu, L.; Bocioc, E.; Gerecu, R. and Vasilean., I., 2013.**The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters of rainbow trout. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi. Vol. 59, pp: 258-263.

۲۸. **Pirarat, N.; Pinpimai, K.; Endo, M.; Katagiri, T.; Ponpornpisit, A.; Chasue, N. and Maita, M., 2011.** Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacilus rhammnosus* GG. Reserch in Veterinary science. Vol. 91, pp: 92-97.

۲۹. **Vadstein, O.; Oie, G.; Olsen, Y.; Salvesen, I.; Skjermo, J. and Skjakbraek, K., 1993.** A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish, Fish Farming Technology. Vol. 43, pp: 167-188.

۳۰. **Vendrell, D.; Balca´zar, J.L.; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I.; Girone´s, O. and Muzqu´iz, J.L., 2006.** *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. Vol. 29, pp: 177-198.

۳۱. **Yasuda, K. and Taga, N., 1980.** A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. Journal of Microbial. Vol. 18, pp:53-62.