Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره سوم، پیاپی پانزدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۵۱-۴۱)

مطالعه شاخص‌های رشد و پارامترهای خون‌شناختی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره مکمل‌سازی شده با بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی

جواد سهندی[۱*]، حجت الله جعفریان[۲]، مهدی سلطانی[۳]، پونه ابراهیمی[٤]

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

۲. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

۳. استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

٤. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/٦ – تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۰/۲۹)

چکیده

ارزیابی تأثیر باکتری‌های مفید تنها در روند رشد خلاصه نشده و جنبه‌های مختلف آن از جمله پارامترهای خونی را نیز شامل می‌شود. در این مطالعه تأثیر دو گونه بیفیدوباکتر *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 و *Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 با سه غلظت CFU g-^{1} ۱×۱۰^{۷}(T۱)، ۲×۱۰^{۷} (T۲) و ۳×۱۰^{۷} (T۳) بر عملکرد رشد و معیارهای خون‌شناختی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن اولیه ۰/۱۹۷ g ± ۰/۵۳۸ مورد بررسی قرار گرفت. لذا تعداد ۳ تیمار آزمایشی و ۱ تیمار شاهد که هر یک دارای ۳ تکرار بود آماده سازی شد. تعداد ۳۰ قطعه لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان درون هر یک از تکرارها جای گرفت. لاروها روزانه ٤ بار بر اساس ۸-٤ ٪ وزن بدن غذادهی شد. بعد از ۸ هفته تغذیه لاروها با جیره مکمل‌سازی شده با بیفیدوباکتریوم‌ها معیارهای رشد و خون‌شناختی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی نتایج مربوط به میزان هموگلوبین بین تیمارهای آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). استفاده از بیفیدوباکترها موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون در تیمارهای آزمایشی T۳ و T۲ شد (P<۰/۰۵). هرچند اختلاف معنی‌داری در مورد حجم متوسط گلبولی و میانگین غلظت همگلوبین در گلبول قرمز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). مطالعه معیارهای خونی و بررسی وزن نهایی و نرخ رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی در این مطالعه نشان داد که استفاده از بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی موجب ارتقاء تعداد سلول‌های خونی و همچنین رشد وزنی در ماهی قزل‌آلا شده است.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، شاخص‌های رشد، خون‌شناختی، بیفیدوباکتریوم، لارو.

* نویسنده مسئول: E-mail: sahandijavad@gmail.com

The study of growth indexes and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae fed supplemented diet with Bifidobacter probiotic

J. Sahandi[1*], H. Jafaryan[2], M. Soltani[3], P. Ebrahimi[4]

1. Former M. Sc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
3. Professor, Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran

(Received: Apr. 26, 2015 - Accepted: Jan. 19, 2016)

Abstract

Evaluation of probiotic is not summarized on growth but included the other aspects, such as blood parameters. In this study, effects of two bifidobacter, *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* with three concentrations of 1×10^{9} (T1), 2×10^{9} (T2) and 3×10^{9} (T2) CFU/100g were studied on growth performance and hematological parameters of rainbow trout larvae with initial body weight of 0.538 ± 0.197 g. Thus 3 experimental treatments and a control, each with three replicates were prepared. Thirty rainbow trout larvae were stocked in each replicate. The larvae were fed 4 times a day according to 4-8% of body weight. After 8 weeks of feeding trail with supplemented diet with Bifidobacterium growth and hematological parameters were studied. The result of hemoglobin showed no significant difference between experimental treatments and the control (P>0.05). The use of Bifidobacter caused increase of red and white blood cells in T3 and T2 treatments (P<0.05). However no significant difference was observed in MCV and MCH (P>0.05). The study of hematological parameters, final weight and specific growth rate in present study showed that the use of bifidobacter increased blood cell account and also the final weight growth in rainbow trout.

Keywords: Rainbow trout, Growth index, Hematology, Bifidobacterium, Larvae.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تغذیه در صنعت آبزی‌پروری همواره از پر هزینه‌ترین بخش‌های تولید بوده است (Jafaryan *et al*., 2008). علم مطالعه تغذیه ماهیان همواره در حال توسعه بوده و نیازمند بررسی‌های بیشتری نیز می‌باشد. اغلب مطالعات صورت گرفته در خصوص تغذیه ماهیان در جهت کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش نرخ رشد ویژه بوده است (Sahandi *et al*., 2012). استفاده از مکمل‌های مختلفی خوراکی همچون باکتری‌های سودمند تحت عنوان پروبیوتیک‌ها از جمله روش‌های شایع در آبزی‌پروری است. پروبیوتیک‌ها شامل گروه‌های عمده‌ای از جلبک‌های ریز، مخمرها، باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشند که به عنوان عوامل تأثیر گذار بر بهبود رشد و زنده‌مانی میزبان شناخته شده هستند (Balcazar *et al*., 2006). افزودن پروبیوتیک‌ها به صورت فرآورده‌های میکروبی- تجاری و یا بومی باعث افزایش رشد و ارتقاء کارآیی تغذیه می‌گردد، به عنوان مثال در مطالعه‌ای Bairagi *et al*. (2004) از باسیلوس‌ها در جیره غذایی ماهی روهو استفاده شد که موجب افزایش کارآیی پروتئین، قابلیت هضم ظاهری و بهره برداری از پروتئین جیره گردید. همچنین استفاده از *Lactobacillus fructivorans* و *Lactobacillus plantarum* در تغذیه لارو ماهی شانک دریایی توانست موجب افزایش رشد لاروها نسبت به گروه شاهد شود (Carnevali *et al*., 2004). در مطالعه‌ای دیگر Tookmechi *et al*. (2012)، جهت بهبود عملکرد رشد در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان از *Lactobacillus rhamnosus*، استفاده نمودند که نتایج معنی‌داری مبنی بر بهبود عملکرد رشد را گزارش نمودند. همچنین در مطالعه Mohammadi *et al*. (2004) از پروبیوتیک تجاری پروتکسین که شامل لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی و یک گونه بیفیدوباکتر (*Bifidobacterium bifidum*) بود در تغذیه لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد که موجب بهبود معیارهای رشد گردید. پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق بهینه‌سازی متابولیسم سوخت و ساز مواد غذایی و ایجاد شرایط اکولوژیکی مطلوب در سیستم‌های پرورشی، عملکرد رشد را ارتقاء دهند (Harikrishnan *et al*., 2010). استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزیان بر ساختار فیزیولوژیکی میزبان تأثیر گذار خواهد بود. در بررسی علل بهبود رشد در نتیجه استفاده از پروبیوتیک‌ها Lesel (1991) گزارش داد که جمعیت میکروبی تلقیح شده به دستگاه گوارش بر روی سطوح مواد غذایی، ترشحات موکوسی و سلول‌های اپیتیال روده تأثیر دارد. مسلماً تأثیر باکتریایی دستگاه گوارش خون را تحت تأثیر قرار خواهد داد چرا که خون به عنوان یک بافت حیاتی سیال از مهمترین مایعات پیکره جانوران تلقی می‌شود که تحت تأثیر محیط تغییر می‌نماید (Affonso *et al*., 2002). در همین زمینه Al-Dohail *et al*. (2010) از پروبیوتیک‌ها در تغذیه لارو گربه‌ماهی آفریقایی استفاده نمودند که موجب بهبود پارامترهای خون شناختی در لاروها گردید. نتایج مشابهی نیز توسط Panigrahi *et al*. (2005) در مورد لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردید. جنس بیفیدوباکتریوم‌ها از جمله باکتری‌های پروبیوتیکی گرم مثبت می‌باشند که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. بیفیدوباکتریوم‌ها از جمله گونه‌های پروبیوتیکی هستند که تاکنون مطالعات اندکی در خصوص آنها صورت گرفته است (Tomasik & Tomasik, 2003). با تمام این توضیحات این مطالعه با هدف بررسی تأثیر دو گونه باکتری اسیدلاکتیک متعلق به جنس بیفیدوباکتریوم تحت عناوین علمی *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 و *Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 بر معیارهای رشد و خون‌شناختی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره ۶۰ روزه پرورش اجرا شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ماهی مورد مطالعه

تعداد ۴۷۰ قطعه لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن اولیه ۰/۵۳۸±۰/۱۹۷g و میانگین طول کل ۱/۲۴± ۳/۰۶ سانتیمتر از پرورشگاه ماهیان سردابی گل چشمه تهیه گردید (مازندران، ایران). لاروها در کیسه‌های پلاستیکی با حجم ۱به ۳ از آب و اکسیژن بسته‌بندی شده و به آزمایشگاه آبزی‌پروری منتقل گردید. لاروها طی مدت ۱۴ روز جهت تطبیق با محیط در حوضچه پلاستیکی با ظرفیت ۱۰۰۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند. همچنین پارامترهای کیفی آب شامل دما، سختی، pH، قلیائیت و شوری در طول دوره مطالعه اندازه‌گیری و ثبت گردید.

پروبیوتیک مورد استفاده

در این مطالعه از دوگونه پروبیوتیک اسید لاکتیک تحت عناوین علمی *Bifidobacterium animalis* PTCC-1631 و *Bifidobacterium lactis* PTCC-1736 با سه غلظت ۱×۱۰^{۷} (T۱)، ۲×۱۰^{۷} (T۲) و ۳×۱۰^{۷} (T۳) واحد کلنی درگرم غذا استفاده گردید. پروبیوتیک‌های مذکور از مرکز کلکسیون‌های قارچ و باکتری صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه و در محیط MRS آگار تولید شرکت مرک آلمان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C در سطح هوازی کشت داده شد. از محلول نیمه مک فارلند (Mac Farland) جهت تعیین تعداد باکتری‌ها طبق روش کدورت سنجی (Optimal density) استفاده شد. جهت رقیق‌سازی و افزودن غلظت‌های مورد نظر از سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ استفاده گردید (Gomez-Gil *et al*., 1998).

طرح آزمایش

لاروها در ۴ تیمار (۳ تیمار آزمایشی و ۱ تیمار شاهد) با سه تکرار درون حوضچه‌های پلاستیکی ۱۵ لیتری با تراکم ۲ لارو در هر لیتر جهت مطالعه‌ای ۸ هفته‌ای تقسیم‌بندی شدند. تقسیم‌بندی لاروها به صورت کاملاً تصادفی صورت گرفت. جیره مصرفی به صورت تجاری تهیه گردید و لاروها در طول دوره روزانه ۴ بار (۸:۰۰، ۱۲:۰۰، ۱۶:۰۰ و ۲۰:۰۰) بر اساس ۴ تا ۸٪ وزن بدن تغذیه شدند. دوره روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در طول دوره مطالعه اعمال گردید. غلظت مورد نظر برای هر تیمار به جیره غذایی همان تیمار افزوده و جهت تغذیه ماهیان استفاده شد. جهت بیان ساده تیمارها از نامگذاری به شکل C (تیمار شاهد)، T۱ (جیره حاوی ۱×۱۰^{۷})، T۲ (جیره حاوی ۲×۱۰^{۷}) و T۳ (۳×۱۰^{۷}) بر اساس CFU در گرم غذا استفاده شد. برای تغذیه گروه شاهد از جیره پایه فاقد پروبیوتیک استفاده شد. جیره‌ها پس از اسپری شدن پروبیوتیک در دمای اتاق خشک شده و در جای خشک و خنک نگهداری گردید (Ghosh *et al*., 2002).

بررسی پارامترهای رشد و بقاء

در انتهای دوره مطالعه تمام ماهیان صید، بیهوش و مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. طول لاروها با استفاده از تخته زیست‌سنجی با دقت mm ۱ و وزن آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت g ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری و ثبت شد. در طول دوره مطالعه تعداد تلفات لاروها ثبت شد و در پایان مطالعه بر اساس رابطه زیر درصد بقاء لاروها محاسبه گردید.

$$\text{درصد زنده‌مانی} = \frac{(\text{تعداد اولیه} - \text{تلفات هر تیمار})}{\text{تعداد اولیه}} \times ۱۰۰$$

همچنین در پایان دوره آزمایش و انجام زیست-سنجی نهایی وزن نهایی، نرخ رشد ویژه و کارآیی تبدیل رشد و میانگین رشد روزانه با استفاده از فرمول‌های موجود مورد محاسبه قرار گرفت:

$$\text{کارایی تبدیل غذایی} = \frac{\text{وزن توده زنده به دست آمده (g)}}{\text{غذای خورده شده (g)}}$$

www.SID.ir

Archive of SID

نرخ رشد ویژه =

$$\frac{\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی}}{\text{دوره پرورش (روز)}} \times ۱۰۰$$

میانگین رشد روزانه =

$$\frac{\text{وزن اولیه ماهی (g)} - \text{وزن نهایی ماهی (g)}}{\text{دوره پرورش (روز)}}$$

اندازه‌گیری معیارهای خون‌شناختی

جهت مطالعه معیارهای خونی تعداد ۵ عدد لارو از هر تکرار به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی با محلول پودر گل میخک جهت مطالعه خون‌شناختی مورد خونگیری قرار گرفتند. برای خونگیری از ماهیان از محل ساقه دمی از سرنگ انسولین استفاده شد. برای اندازه‌گیری معیارهای خونی از قبیل تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکرت و هموگلوبین نمونه‌های خون تهیه شده درون ویال‌های حاوی ۲۰ µL ماده ضد انعقاد هپارین ریخته شدند. تعداد گلبول‌های قرمز خون و تعداد گلبول‌های سفید خون پس از رقیق‌سازی خون به ترتیب به نسبت ۲۰۰ یا ۵۰ برابر با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید (Houston, 1985). شمارش کلی گلبول‌های قرمز و سفید ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هموسیتومتر صورت گرفت برای این کار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق کنند Natt- Herrick استفاده شد (Bullis, 1993). هموگلوبین به روش استاندارد با استفاده از کیت سنجش هموگلوبین ساخت شرکت زیست شیمی (تهران– ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. همچنین برای اندازه‌گیری حجم فشرده گلبولی از روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت استفاده شد. سایر شاخص‌های خونی با استفاده از فرمول‌های استاندارد طبق مطالعه Campbell & Ellia (2007) ارائه شده در ذیل محاسبه گردید:

$$\text{حجم متوسط گلبولی (Mean corpuscular volume)} = \frac{(\text{Hct}\times 10)}{\text{RBC (fL)}}$$

Hct: میزان هماتوکریت

RBC: گلبول‌های قرمز

$$\text{میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (Mean corpuscular hemoglobin)} = \frac{(\text{Hb}\times 10)}{\text{RBC (pg)}}$$

Hb: میزان هموگلوبین

RBC: گلبول‌های قرمز خون

$$\text{تغییرات میانگین غلظت هموگلوبین (Mean corpuscular hemoglobin (concentration} = \frac{\text{MCH}}{\text{MCV}} \times ۱۰۰(\text{g/dL})$$

سنجش فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان در پایان دوره مطالعه

به این منظور تعداد ۵ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در انتهای دوره به منظورسنجش تراکم کلنی‌های باکتریایی دستگاه گوارش انتخاب شده و به مدت ۲۴ ساعت جهت تخلیه کامل روده قطع غذادهی شدند و با ضربه به سر بیهوش گردیدند. جهت استریل نمودن سطح خارجی بدن ماهیان، به مدت یک دقیقه در بنزالکونیوم کلراید ۱٪ قرار داده شده و سپس با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. ناحیه شکمی بچه ماهیان در محیطی کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی شکافته و روده آن ها پس از جداسازی، در هاون چینی استریل همراه با محلول نمکی نرمال استریل (۰/۹٪ w/v NaCl) استریل هموژن گردید. پس از تهیه هموژن با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل رقت‌های سریالی در دامنه $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$ تهیه گردید. از رقت‌های فوق تحت شرایط استریل توسط نمونه بردار، حجمی معادل ۰/۱ mL^{-1} برداشت و به پلیت حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (شمارش کلی باکتریایی) و MRS آگار (تشکیل کلنی توسط باکتری‌های اسید

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتیک) منتقل و در سطح آن پخش گردید. پلیت‌های فوق به مدت۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوباسیون شده و نهایتاً شمارش باکتری‌های هر پلیت بر حسب واحد کلنی (تعداد کلنی‌های باکتریایی رشد یافته بر روی محیط کشت×عکس ضریب رقیق‌سازی) به ازای هر گرم وزن روده تعیین شد (Mahios *et al*., 2006).

روش آماری مورد استفاده

این مطالعه بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها پس از ثبت آن‌ها در نرم‌افزار Excel با استفاده از نرم‌افزار SPSS از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan انجام، و وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) تعیین شد.

نتایج

پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما (۱۷/۶۶±۱/۳۳°C)، pH (۷/۶۳±۰/۰۸)، هدایت الکتریکی (۳۰۱۲/۶۲±۴۵۰/۰۳ µmhos cm)، شوری (۲/۰۱±۰/۱۳mg L^{-1})، قلیائیت (۲۴۰mmol L^{-1}) و سختی کل (۳۹۱/۶ mg L^{-1}) اندازه‌گیری گردید که اساس نیازمندی‌های گونه قزل‌آلا مناسب بود. نتایج تأثیر دو گونه بیفیدوباکتر مصرفی در مطالعه حاضر بر معیارهای رشد در جدول ۱ آورده شده است. در خصوص نتایج مربوط به وزن نهایی نتایج نشان دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار T۱ و T۲ نسبت به شاهد بود (P<۰/۰۵). کمترین میانگین وزنی به دست آمده مربوط به گروه شاهد به میزان ۲۰/۹۸±۴/۳۹ گرم و بیشترین میزان ۲۴/۹۸±۶/۱۰ گرم مربوط به تیمار T۱ بود که از جیره حاوی ۱×۱۰^{۷} واحد کلنی در گرم غذا تغذیه شده بود. نرخ کارایی غذایی در تیمار آزمایشی T۱ بیشترین میزان و شاهد کمترین میزان را نشان داد (P<۰/۰۵). نرخ رشد ویژه در لاروهای قزل‌آلا در تیمار آزمایشی T۱ بیشترین میزان را داشت و تیمار T۲ و T۳ در رتبه-های بعدی قرار داشت. اختلاف معنی‌داری در مورد پارامترهای رشد بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵).

درصد بقاء لاروها در تیمارهای آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است که موید اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی و شاهد می‌باشد. تیمار T۱ با داشتن بالاترین نرخ زنده‌مانی دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و شاهد بود. با این وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی T۲ و T۳ در این خصوص مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

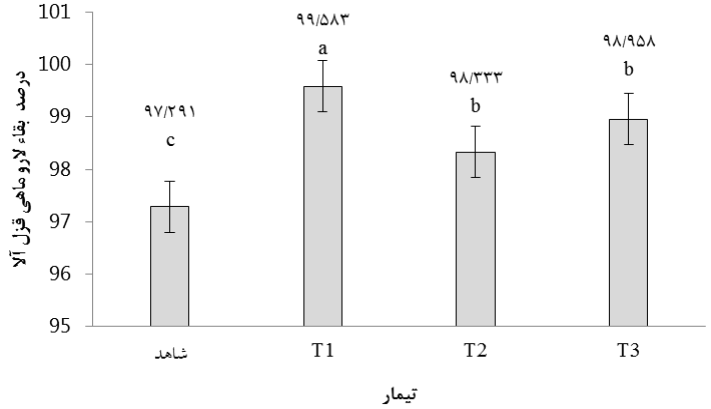
جدول ۱. معیارهای رشد لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مکمل‌سازی شده با بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی

معیارهای رشد	تیمارها			
	شاهد (فاقد پروبیوتیک)	T۱ (۱×۱۰^{۷} CFU g)	T۲ (۲×۱۰^{۷} CFU g)	T۳ (۳×۱۰^{۷} CFU g)
میانگین وزن نهایی (g)	$۲۰/۹۸ \pm ۴/۳۹^{c}$	$۲۴/۹۸ \pm ۶/۱۰^{a}$	$۲۳/۰۶ \pm ۴/۸۴^{b}$	$۲۰/۷۰ \pm ۴/۶۲^{c}$
کارایی تبدیل غذایی (g)	$۰/۸۷ \pm ۰/۱۸^{c}$	$۱/۰۴ \pm ۰/۲۵^{a}$	$۰/۹۶ \pm ۰/۲۰^{b}$	$۰/۸۶ \pm ۰/۱۹^{c}$
نرخ رشد ویژه	$۵/۹۵ \pm ۰/۳۲^{c}$	$۶/۴۶ \pm ۰/۴۰^{a}$	$۶/۲۹ \pm ۰/۳۵^{b}$	$۶/۰۱ \pm ۰/۳۶^{c}$
میانگین رشد روزانه (٪)	$۳۴/۰۲ \pm ۷/۳۲^{c}$	$۴۰/۸۰ \pm ۱۰/۱۸^{a}$	$۳۷/۵۸ \pm ۸/۶۰^{b}$	$۳۳/۵۹ \pm ۷/۷۰^{c}$

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. نمودار درصد بقاء لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مکمل‌سازی شده با بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی.
(حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).)

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در مورد میزان هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی و میانگین غلظت همگلوبین در گلبول قرمز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). اما در خصوص سایر معیارهای خونی اختلافات معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲. معیارهای خون‌شناختی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مکمل‌سازی شده با بیفیدوباکترهای پروبیوتیکی

معیارهای خونی	تیمارها			
	شاهد (فاقد پروبیوتیک)	T۱ ۱×۱۰^{۷} CFU g	T۲ ۲×۱۰^{۷} CFU g	T۳ ۳×۱۰^{۷} CFU g
هماتوکریت (٪)	۴۱/۳۳± ۵/۵۰^{a}	۳۰/۳۳ ± ۶/۶۵^{b}	۲۲/۶۶ ± ۴/۵۰^{b}	۳۰/۳۳ ± ۲/۵۱^{b}
هموگلوبین ($g\ dL^{-1}$)	۵/۱۳ ± ۰/۳۷^{a}	۶/۱۴ ± ۲/۷۸^{a}	۵/۷۶ ± ۲/۸۷^{a}	۵/۵۸ ± ۱/۲۹^{a}
گلبول قرمز خون ($۱۰^{۶} mm^{۳} cell$)	۱/۵۳ ± ۰/۱۲^{b}	۰/۹۹ ± ۵۷/۰۱^{b}	۰/۹۰ ±۲۱/۱۲^{c}	۱/۶۳ ± ۰/۲۲^{a}
گلبول سفید خون ($۱۰^{۳} cell\ \mu L^{-1}$)	۳۴/۶۱ ± ۹۸/۹۱^{c}	۳۶/۳۷ ± ۷۲/۳۴^{b}	۵۹/۱۰ ± ۱۸/۱۶^{a}	۴۳/۵۶ ± ۸۱/۴۵^{b}
MCV (fL)	۲۶۸/۳۵ ± ۱۷/۴۴^{a}	۳۶۸/۲۰ ± ۲۰۹/۰۳^{a}	۲۵۴/۷۰ ± ۴۱/۵۲^{a}	۱۸۶/۱۹ ± ۱۰/۴۲^{a}
MCH (pg)	۳۳/۷۱ ± ۴/۹۴^{a}	۶۵/۷۴ ± ۲۰/۷۱^{a}	۶۳/۷۸ ± ۲۸/۵۲^{a}	۳۴/۰۹ ± ۷/۰۴^{a}
MCHC ($g\ dL^{-1}$)	۱۲/۶۵ ± ۲/۴۶^{c}	۲۰/۱۴ ± ۷/۶۰^{b}	۲۴/۵۱ ± ۷/۶۵^{a}	۱۸/۲۹ ± ۳/۴۲^{b}

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

سنجش فلور باکتریایی دستگاه گوارش

نتایج مربوط به سنجش فلور میکروبی دستگاه گوارش در جدول ۳ نشان داده شده است. تعداد باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت باکتریایی تریپتیک سوی آگار با وجود افزایش در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). نتیجه مشابهی در خصوص تعداد کلنی‌های کل مشاهده گردید (P<۰/۰۵). با این حال استفاده از بیفیدوباکتریوم‌ها در جیره غذایی لاروها موجب افزایش تعداد کلنی‌های باکتری اسید لاکتیک در دستگاه گوارش گردید بطوریکه تیمار T۱ تغذیه شده با کمترین غلظت بیشترین میزان واحد کلنی در گرم وزن روده را دارا بود (P<۰/۰۵). همچنین تیمار T۳ پس از آن در جایگاه بعدی قرار داشت. اختلاف

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری در سایر تیمارها با تیمار شاهد مشاهده نگردید (P<۰/۰۵).

جدول ۳. فلور میکروبی روده لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره مکمل‌سازی شده با غلظت‌های متفاوت بیفیدوباکتریوم

	فلور میکروبی غیر اسید لاکتیک CFU/g	فلور میکروبی اسید لاکتیک CFU/g
شاهد	$۳/۰۵۷ \times ۱۰^{۵} \pm ۶/۴۸^{a}$	$۱/۳۹۴ \times ۱۰^{۵} \pm ۱/۳۳^{b}$
تیمار T۱	$۵/۷۰۴ \times ۱۰^{۵} \pm ۸/۴۶^{a}$	$۶/۷۸۰ \times ۱۰^{۵} \pm ۸/۷۵^{a}$
تیمار T۲	$۵/۷۱۲ \times ۱۰^{۵} \pm ۲/۶۴^{a}$	$۲/۴۹۰ \times ۱۰^{۵} \pm ۲/۳۴^{b}$
تیمار T۳	$۲/۱۲۳ \times ۱۰^{۵} \pm ۱/۱۶^{a}$	$۳/۰۵۷ \times ۱۰^{۵} \pm ۳/۳۴^{ab}$

حروف غیر همسان در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵).

بحث

کنترل جمعیت میکروبی مراحل اولیه زیست آبزیان در طول مدت پرورش اولیه از موارد ضروری بوده و در این راستا بکارگیری باکتری‌های پروبیوتیکی در جهت مدیریت میکروبی امری غیرقابل اجتناب می‌باشد (Olafsen & Hansen, 1992). مطالعات در مورد گونه‌های اسید لاکتیک به عنوان ارگانیسم‌های تولیدکننده اسید لاکتیک که از تخمیر همگن قندها ایجاد می‌شود مدت‌ها است که آغاز گردیده است (Balcazar *et al*., 2006). دو گونه باکتری پروبیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه عضوی از لاکتوباسیلوس‌ها بوده و متعلق به جنس Bifidobacterium می‌باشند که تحت عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند (Charteris *et al*., 1998; Gill *et al*., 2001). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن این دو گونه پروبیوتیک به جیره لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث بهبود معنی‌دار پارامترهای رشد و درصد بقاء می‌شود. Tookmechi *et al.* (2012) جهت بهبود عملکرد رشد در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان از *Lactobacillus rhamnosus* استفاده نمودند که نتایج مشابهی را مشاهده نمودند. همچنین در مطالعه Mohammadi *et al.* (2004) از پروبیوتیک پروتکسین در تغذیه لاروهای قزل‌آلا استفاده شد که موجب بهبود پارامترهای رشد از جمله نرخ رشد ویژه گردید. مشابه با این یافته‌ها در مطالعه حاضر لاروهای تغذیه شده با جیره حاوی ۱×۱۰^{۷} CFU g بیشترین وزن را نسبت به سایر تیمارها کسب کردند که با سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). علاوه بر افزایش وزن تأثیر پروبیوتیک مصرفی بر سایر پارامترهای رشد همچون نرخ رشد ویژه و میانگین رشد روزانه معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در مطالعه‌ای مشابه Carnevali *et al.* (2006) گزارش دادند که استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها در جیره غذایی باس دریایی سبب بهبود عملکرد رشد این گونه گردید. احتمالاً افزایش رشد تحت تأثیر فعالیت بیفیدوباکتریم‌ها مربوط به بهبود عملکرد دستگاه گوارش است چرا که بر اساس گزارش Lesel (1991) پروبیوتیک‌ها فلور میکروبی دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر اساس یافته Ghosh *et al.* (2002) پروبیوتیک‌ها قادر به تولید آنزیم‌های خارج سلولی هستند و این آنزیم‌ها در فرآیند هضم و جذب ترکیبات غذایی مؤثر خواهد بود (Wache *et al*., 2006). حال آنکه چرا در تیمار T۱ بیشترین رشد و درصد بقاء را داشتیم باید گفت که بر اساس گزارش Jafariyan *et al.* (2008) و Sahandi *et al.* (2012) افزایش غلظت پروبیوتیک‌ها الزاما به افزایش رشد منجر نخواهد شد و هدف از انتخاب غلظت‌های مختلف یافتن غلظت مؤثر است. درصد زنده‌مانی لاروها بین تیمارها (شکل۱)، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد بود (P<۰/۰۵). این نتایج در موافقت با نتایج Sahandi *et al.* (2012)، Jafariyan *et al.* (2008) در استفاده از پروبیوتیک‌ها و تأثیر آن‌ها بر میزان زنده‌مانی آبزی میزبان می‌باشد. افزایش درصد زنده‌مانی در طول دوره پرورش لاروهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک‌ها به علت‌های مختلف از جمله کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت میکروبی مضر به علت رقابت پروبیوتیک‌ها و جلوگیری از افزایش آن‌ها (Ouwehand *et al.*, 1999; Sarem-Damerdjii *et al.*, 1995) تولید متابولیت‌ها و جلوگیری از رشد عوامل پاتوژن (Reid & Burton, 2002)، بهبود عملکرد تغذیه و هضم (Jafaryan *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2002) صورت می‌گیرد. نتایج مربوط به تعداد سلول‌های قرمز خون نشان داد استفاده از بیفدوباکترهای در غلظت ۳×۱۰^{۷}CFUg علی‌رغم عدم تأثیر بر افزایش وزن لاروها موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمزخون در تیمار T۳ ($۱/۶۳\pm۰/۲۲$ $۱^{۶}$ mm^3 cell) گردید ($P<۰/۰۵$). گلبول‌های سفید یا لکوسیت‌ها در واقع همان گلبول‌های فاقد رنگدانه هستند که در ایمنی بدن موجود نقش دارند که تعداد آن‌ها نیز در تیمارهای آزمایشی افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). موافق با این یافته در مطالعه Al-Dohail *et al.* (2009) استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمزخون در تیمارهای آزمایشی گربه ماهیان انگشت قد آفریقای در مقایسه با تیمار شاهد شدند. این افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون را می‌تواند به علت افزایش هضم و جذب ترکیبات غذایی جیره و افزایش بهره‌بردای از ترکیبات آن همچون آهن باشد و یا تحت تأثیر سایر پارامترهای فیزیولوژیکی ماهی افزایش یافته باشد که از آنجمله می‌توان به افزایش سوخت و ساز بدن اشاره کرد. تعداد گلبول‌های سفید خون در این مطالعه نشان داد استفاده از بیفیدوباکتریوم در هر سه غلظت موجب افزایش تعداد این سلول‌های خونی خواهد شد. این نتیجه به نحوی با درصد بازماندگی لاروها در طول دوره مطالعه دارای همبستگی معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$، $r=۰/۹۸۷$). احتمالاً استفاده از بیفیدوباکترها با تحریک سیستم ایمنی لاروها موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید و همچنین افزایش درصد بقاء شده است. کمترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار شاهد، cell µL $۳۴/۶۱\pm۹۸/۹۱\times۱۰^{۳}$ و بیشترین تعداد آن در تیمار T۲ cell µL $۵۹/۱۰\pm۱۸/۱۶\times۱۰^{۳}$ مشاهده گردید. همسو با این نتایج Lin *et al.* (2012) در مطالعه خود گزارش دادند که استفاده از *Bacillus coagulans* با غلظت CFU g ۱×۱۰^{۹} در جیره غذایی کپور کوی، *Cyprinus carpio koi* موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید این گونه نسبت به تیمار شاهد گردید. همچنین در مطالعه Al-Dohail *et al.* (2009) استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید در گربه ماهیان انگشت قد شد. در مورد میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت اختلاف معنی‌داری بین‌تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). در مورد عدم اختلاف معنی‌دار هموگلوبین نتایج حاضر در موافقت با نتایج مطالعه Panigrahi *et al.* (2005) بود. در مورد سایر شاخص‌های خونی در مطالعه Al-Dohail *et al.* (2009) اختلاف معنی‌داری بین تیمار آزمایشی و تیمار شاهد در خصوص حجم متوسط گلبولی، میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز و تغییرات میانگین غلظت هموگلوبین وجود داشت ($P<۰/۰۵$). این در حالی بود که در مطالعه حاضر تنها در مورد تغییرات غلظت هموگلوبین اختلاف معنی‌دار مشاهده شد و طی آن تیمار شاهد کمترین تغییرات را داشت و تیمار T۲ بیشترین تغییرات را نشان داد. این تغییرات احتمالاً به سبب فعالیت میکروبی دستگاه گوارش به عنوان تنها عامل متغییر در این مطالعه می‌باشد. در همین زمینه Hooper *et al.* (2001) گزارش دادند فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش میزبان نقش مهمی را در سلامتی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی بازی می‌کنند. پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های زیست‌مند موجب بهبود تعادل میکروبی دستگاه گوارش می‌شوند (Gram *et al.*, 1999). نتایج مطالعه حاضر نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مختلف و تیمار شاهد از نظر تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های غیر اسید لاکتیک وجود ندارد. هرچند بیشترین تعداد آن‌ها در تیمارهای T۱ (CFU g $۵/۷۰۴\pm۸/۴۶۸\times۱۰^{۵}$) و T۲ (CFU g $۵/۷۱۲\times۱۰^{۵}\pm۲/۶۴۱$) مشاهده شد. استفاده از بیفیدوباکتریوم‌ها موجب افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در T۱ (CFU g $۶/۷۸۰\times۱۰^{۵}\pm۸/۷۵۳$) نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی گردید. تیمار شاهد کمترین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (CFU g $۱/۳۹۴\times۱۰^{۵}\pm۱/۳۳۴$) را داشت. افزایش تعداد باکتری‌های لاکتیکی احتمالاً در اثر غلظت مناسب مصرفی در این تیمار بوده است و در غلظت‌های بالا افزایش تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها موجب کاهش شرایط رشد مناسب برای این پروبیوتیک بوده است. نتایج مربوط به رشد نیز در تیمار T۱ به طرز معنی‌داری بالا بود. هرچند این تغییر در تعداد کلنی‌های لاکتوباسیلوس‌ها پس از دوره ۶۰ روزه مطالعه نمایان گردید که با مطالعه Ghomi *et al.* (2010) مطابقت دارد. بر اساس مطالعه Abraham *et al.* (2008) ساختار میکروبی دستگاه گوارش ماهیان با ورود باکتری‌های موجود درمحیط و غذا قابل تغییر است. افزایش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در دوره بلندمدت اتفاق خواهد افتاد و این موضوع توسط Ghomi *et al.* (2010) در مورد ماهی سفید دریای خزر، *Rutilus frisii kutum* مورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شده است. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان بیفیدوباکتریوم‌های استفاده شده در این تحقیق را مؤثر بر روند رشد، بقاء و همچنین بر معیارهای خونی دانست. مجموعاً این مطالعه و مطالعات مشابه می‌تواند دستورالعمل استفاده از پروبیوتیک‌ها در جهت افزایش رشد، بقاء و مقاومت لاروها باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری صمیمانه دکتر جواد بیات کوهسار مدیریت آزمایشگاهای دانشگاه گنبد کاووس و همچنین از همکاران محترم ایشان مهندس جعفرزاده و مهندس حسینی و سرکار خانم مهندس سراوانی ابراز می‌دارند. این مطالعه در قالب طرح پایانامه کارشناسی ارشد طراحی و اجرا گردید.

REFERENCES

Abraham, TJ.; Mondal, S.; Babu, ChS.; (2008). Effect of comercial aquaculture probiotic and fish gut antagonistic bacterial flora on the growth and disease resistance of ornamental fishes *Carassius auratus* and *Xiphorus helleri*, Ege Univ. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences; 1: 27-30.

Affonso, EG.; Polez, VLP.; Correa, CF.; Mazoa, AF.; Araujo, MRR.; Moraes, G.; (2002). Blood parameters and metabolites in teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology; 33: 375-382.

Al-Dohai, MA.; Hashim, R.; Aliyu-Paiko, M.; (2011). Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research; 42: 196- 209.

Bairagi, A.; Ghosh, KS.; Sen, SK.; Ray, AK.; (2004). Evaluation of the nutritive value of Leucaena leucocephala leaf meal , inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. Aquaculture Research; 35: 436-446.

Balcazar, JL.; De Blas, I.; Ruiz-Zazuela, I.; Cunningham, D.; Vandrell, D.; Muzquiz, JL.; (2006). The role of

www.SID.ir

Archive of SID

probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology; 114: 173-186.

Bullis, RA.; (1993). Clinical pathology of temperate freshwater and estuarine fishes. In: Stoskopf MK (ed) Fish medicine. W.B. Sanders. CO., Philadelphia, USA. p. 232-239.

Campbell, TW.; Ellia, CK.; (2007). Avian and exotic animal hematology and cytology, 3rd edn, Blackwell Puplishing, Iowa, USA. p. 93-112.

Carnevali, O.; Zamponi, MC.; Sulpizo, P.; Rollo, A.; Nardi, M.; Orpianesi, C.; Silvi, S.; Caggiano, M.; Polzonetti, AM.; Cresci, A.; (2004). Administration of probiotic strain to improve sea bream wellenss during development. Aquaculture International; 12: 377-386.

Charteris, WP.; Kelly, PM.; Morelli, L.; Collins, JK.; (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Bifidobacterium isolates from the human gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology; 26: 333-337.

Ghomi, MR.; Heshmatipour, Z.; Nazari, RM.; Sohrabnejad, M.; Zarei, M.; Nikoo, M.; Ovissipour, M.; EsmaeiliMolla, A.; (2010). Intestinal microfora of Kutum *Rutilus frisii kutum* under dietary supplemetation with probiotic and vitamin C. Bulgarian Journal of Agricultural Science; 16(5): 635-642.

Ghosh, K.; Sen, SK.; Ray, AK.; (2002). Growth and survival of Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. Acta *Ichthyol.* Pisc, 32(1): 83-92.

Gill, HS.; Rutherfurd, KJ.; Cross, ML.; Gopal, PK.; (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. The American Journal of Clinical Nutrition; 74: 833-839.

Gomez-Gill, B.; Herrera-Vega, MA.; Aberu-Grobis, FA.; Roque, A.; (1998). Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the Brine shrimp (*Artemia fransiscana*). Applied and Environmental Microbiology; 64: 2318- 2322

Gram, L.; Melchiorsen, J.; Spanggaard, B.; Huber, I.; Nielsen, TF.; (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology; 65: 969-973.

Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Heo, M.; (2010). Supplementation diet containing probiotic, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*, Fish Aquacul J.; 4: 1- 11.

Hooper, LV.; Wong, MH.; Thelin, A.; Hansson, L.; Falk, PG.; Gordon, JI.; (2001). Molecular analysis of commensal Host-Microbial relationship in the intestine. Science; 291: 881-884.

Houston, AH.; (1190). Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyle PB, (eds). Methods for fish biology. American fisheries society: Bethesda, Maryland; 273-335.

Graham, MS.; Fletcher, GL.; Benfey, TJ.; (1985). Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. Aquaculture, 50: 133-139.

Jafaryan, H.; Morovat, R.; Shirzad, H.; (2008). The use of bioencapsulated *Daphnia magna* by probiotic bacillus and their effect on the growth of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Iran. J. Biol.; 21: 24-35. (in Persian)

Lesel, R.; (1991). Does a digestive active bacterial flora exist in fish? In: Fish Nutrition in Practice. Biarritz, France, pp. 655-664: 1993.

Lin, Sh.; Mao, Sh.; Guan, Y.; Luo, L.; Luo, L.; Pan, Y.; (2012). Effect of dietary chitosan oligosaccharids and *Bacillus coagulans* on the growth,

www.SID.ir

Archive of SID

innate immunity and resistance of Koi (*Cyprinus carpio koi*). Aquaculture; 342-343: 36-41.

Mahios, AS.; Gatesoupe, FJ.; Hervi, M.; Metailler, R.; Ollevier, F.; (2006). Effect of dietary inulin and oligosaccharides and other prebiotics for weaning turbot, *Psetts maxima*. (Linnaeus, C. 1758). Aquacul. Int.; 14: 219-229.

Mohammadi-Azarm, H.; Abedian-Kenari, A.; Abtahi, B.; (2004). The effects of Protxin probiotic on growth and surviavl of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Iran. J. Mar. Sci.; 3(2, 3): 69-75. (in Persian)

Olafsen, JA.; Hansen, GH.; (1992). Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. J. Fish Biol; 40: 141-156.

Ouwehand, AC.; Kirjavainen, PV.; Gronlund, MM.; Isolauri, E.; Salminen, S.; (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. Int. Dairy J.; 9: 623-630.

Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S.; Sugita, H.; (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture; 243: 241-254.

Reid, G.; Burton, J.; (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microb. Infect; 4: 319-324.

Sahandi, J.; Jafaryan, H.; Roozbehfar, R.; Babaei, S.; Dehestani, M.; (2012). The use of two enrichment forms (*Brachionus plicatilis* enrichment and rearing water enrichment) with probiotic bacilli spore on growth and survival of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), Iran. J.Vet. Res.; 13(4): 289-295.

Sarem-Damerdjii, LO.; Sarem, F.; Marchal, L.; Nicolas, JP.; (1995). In vitro colonisation ability of human colon mucosa by exogenous Lactobacillus strains. FEMS Micorbiol. Lett.; 131: 133-137.

Tomasik, PJ.; Tomasik, P.; (2003). Probiotics and Prebiotics. Cereal. Chem.; 80(2): 113-117.

Tookmechi, A.; Shamsi, H.; Delshad, R.; Ghasemi Moghanjoei, A.; (2012). Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the grow th and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Iran. Sci. Fish. J.; 21(3): 13-22. (in Persian)

Wache, Y.; Auffray, F.; Gatesoupe, FJ.; Zambonino, J.; Gayet, V.; Labbé, L.; Quentel, C.; (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* fry. Aquaculture; 258: 470-478.

www.SID.ir