Archive of SID



# تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک و آهن بر برخی فاکتورهای خونی آلوین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)

**سمیرا ناصری*[۱]، شعبانعلی نظامی[۲]، حسین خارا[۳]، علی فرزانفر[۴]، متین شکوری[۵]**

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۳- دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۴- مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی ایران، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۴۶۷-۴۶۸۱۵

۵- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، قائمشهر، ایران، صندوق پستی: ۱۶۳

Samiranaseri@Hotmail.com

**چکیده**

در تحقیق جاری اثر بیوپلاس ۲- ب[۱] و ترکیب آهن[۲] بر برخی فاکتورهای خونی آلوین قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۳۵ گرم) در ۹ تیمار با سه تکرار به مدت ۶۰ روز بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱: پروبیوتیک به مقدار $1/6\times10^{9}$ CFU[۳] در هرگرم غذا، ۲: پروبیوتیک به مقدار $1/2\times10^{9}$ CFU در هر گرم غذا، ۳: ۷ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، ۴: ۵ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، ۵: پروبیوتیک به مقدار $1/6\times10^{9}$ CFU در هر گرم غذا و ۷ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، ۶: پروبیوتیک به مقدار $1/6\times10^{9}$ CFU در هر گرم غذا و ۵ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، ۷: پروبیوتیک به مقدار $1/2\times10^{9}$ CFU در هر گرم غذا و ۷ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا؛ ۸: پروبیوتیک به مقدار $1/2\times10^{9}$ CFU در هر گرم غذا و ۵ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا و ۹: جیره شاهد (بدون مکمل سازی با پروبیوتیک و آهن) بود. در انتهای دوره آزمایش تعداد گلبول های قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت خون اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که حداکثر تعداد گلبول های قرمز به ترتیب $1/34\pm0/02\times10^{3}mm^{-3}$ و $1/33\pm0/01\times10^{3}mm^{-3}$، غلظت هموگلوبین به ترتیب $14/97\pm0/07$ g $dL^{-1}$ و $14/83\pm0/08$ g $dL^{-1}$ و درصد هماتوکریت به ترتیب $36/63\pm0/24$ و $35/86\pm0/14$، به تیمارهای ۷ و ۵ اختصاص دارد ($P\leq0/05$). یافته های این تحقیق نشان می دهد که حضور آهن به همراه پروبیوتیک در غذا، منجر به افزایش تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون می‌شود، و تیمار۷، شامل سطح پایین پروبیوتیک ($1/2\times10^{9}$ CFU) و سطح بالای آهن (۷ میلی گرم آهن در هر کیلوگرم غذا)، بهترین تأثیر را بر پارامترهای خونی مورد بررسی در این تحقیق دارد.

**کلمات کلیدی:** قزل آلای رنگین کمان، پروبیوتیک، بیوپلاس ۲- ب، فاکتورهای خونی.

1.BioPlus 2B
2.$Fe(So_4)_2(7H_2O)$
3.Colony Forming Unit

www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

ماهی قزل آلای رنگین کمان ( *Oncorhynchus mykiss*) گونه‌ای با ارزش تجاری بالا می باشد و بیماری های عفونی باکتریایی در بسیاری از مزارع پرورشی یکی از دلایل عمده کاهش میزان تولید می‌باشد. شرایط پرورش ماهی در مرحله لاروی در موفقیت یا عدم موفقیت امر پرورش تأثیر بسزایی دارد (۱۵). در مرحله لاروی، میان کنش های متفاوتی بین باکتری ها و سطوح روده جاندار ممکن است رخ دهد که احتمالاً منجر به تشکیل میکروفلور بومی در موجود می‌گردد و یا زمینه ساز بروز عفونت می‌شود. از این رو برای موفقیت در تولید متراکم و انبوه استفاده از روش‌هایی برای تقویت سیستم های دفاع طبیعی جاندار ضروری به نظر می رسد (۲۳). از جمله مکمل هایی که در غذای لاروها و بچه ماهیان در سطح جهان استفاده می‌گردد، آنتی بیوتیک ها هستند، اما هم اکنون استفاده از آنتی بیوتیک ها به خاطر مضراتی از قبیل ایجاد مقاومت در انسان، سمیت حاصل از پس مانده های آنتی بیوتیکی، حساسیت زایی در انسان و خطرات زیست محیطی آن (۲۹)، اغلب توصیه نمی شود و در عوض به استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان عوامل کنترل زیستی بیشتر سفارش و تاکید می‌گردد (۱).

پروبیوتیک ها مکمل های غذایی هستند که بطور سودمندی با بهبود تعادل فلور میکروبی روده به میزبان سود می رسانند (۱۲). پروبیوتیک ها به روش های مختلفی از قبیل رقابت انحصاری با باکتری های پاتوژن (۳۳)، مشارکت در فعالیت های آنزیمی و غذایی برای گوارش (۱۳)، مثلاً در ماهی ها، باکتری های "*Bacteroides*" و "*Closteridium* sp." با ذخیره اسید چرب و ویتامین ها به تغذیه میزبان کمک می‌کنند(۲۸). به علاوه بعضی باکتری ها در دوکفه‌ای‌ها و قزل‌آلا با تولید آنزیم هایی مانند پروتئازها و لیپازها به هضم مواد غذایی کمک می نمایند (۲۵).همچنین به بهبود و افزایش پاسخ ایمنی در مقابل میکروارگانیسم‌های پاتوژن (۳)، تولید ترکیبات مهارکننده (۷)، رقابت برای مواد شیمیایی و انرژی موجود، رقابت برای محل اتصال، بهبود کیفیت آب، منبع ریز مغذی و درشت مغذی ها (۳۲) و به تعادل میکروبی فلور روده کمک می‌کنند.

اکثر میکروارگانیسم ها برای رشد به آهن نیاز دارند (۲۷) و باکتری های بیماریزای موفق، آنهایی هستند که در رقابت برای جذب آهن مخصوصاً در شرایط کمبود آهن در بافت ها و مایعات بدن میزبان، بتوانند بر رقبای خود غالب شوند (۹). در رقابت برای جذب آهن گروهی از باکتری ها توانایی تولید ترکیباتی مانند سایدروفورها را دارند که این ترکیبات به جذب آهن کمک می‌کنند. پس احتمالاً باکتری های بی ضرری که بتوانند سایدروفور تولید کنند، را می‌توان به عنوان پروبیوتیک علیه عوامل بیماریزایی که نیاز به آهن دارند، به کار برد (۲۹). نیاز برخی از عوامل بیماریزا به آهن زیاد است، مثلاً *Vibrio Anguillarum* نیاز زیادی به آهن دارد به طوری که در آزمایشی که در همین خصوص صورت گرفت، مرگ و میر آزاد ماهیان مورد مطالعه با افزایش سطح آهن در جیره غذایی به صورت خطی افزایش یافت (۱۴و۲۸). این قبیل نتایج نشان دهنده اهمیت و نقش ترکیبات آهن دار در رشد باکتری ها و میکروارگانیسم ها در بدن میزبان است (۲۹).

از طرفی گزارش هایی مبنی بر تأثیر مثبت استفاده از افزودنی غذایی بیوپلاس ۲-ب بر رشد و بازماندگی

www.SID.ir

Archive of SID



خوک، ماکیان (۱۷) و ماهی از جمله قزل‌آلای رنگین کمان (۲و۱۰) وجود دارد. به همین دلیل، در تحقیق حاضر اثر بیوپلاس ۲-ب و آهن از طریق اضافه شدن به غذا، بر برخی فاکتورهای خونی آلوین قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش ها**

این تحقیق در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن و با مشارکت شرکت کریستین هنسن دانمارک[1] انجام گرفت. برای این منظور تعداد ۲۷۰۰ عدد آلوین قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۰/۱۳۵±۰/۰۱ گرم در ۲۷ تراف کالیفرنیایی (با ابعاد ۲۲۰×۳۵×۲۰)، با تراکم ۱۰۰ عدد در هر تراف به مدت ۶۰ روز نگهداری گردید. آب ورودی از چشمه و با دبی ۰/۵ لیتر در دقیقه، تحت فشار همراه با هوادهی به صورت اسپری وارد هر تراف می شد. تحقیق مورد بررسی شامل ۹ تیمارو هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد.

فرآورده میکروبی مورد استفاده، یک نوع پروبیوتیک تجاری شامل دو گونه باکتری *Bacillus licheniformis* و *B. subtilis* (به تعداد $۴\times۱۰^{۴}$ باکتری در هر گرم از پودر این فرآورده و با نسبت ۱:۱ از هر دو سویه باکتری مذکور) می باشد که از شرکت کریستین هنسن تهیه گردید. آهن مورد استفاده نیز از محلول آهن فریرون (هر یک میلی لیتر محتوی: ۱۲۵ میلی گرم فروس سولفات هپتا هیدرات[2] معادل ۲۵ میلی گرم آهن) (۲۲) تامین شد.

به منظور تغذیه آلوین ها یک نوع غذای خشک پلت از شرکت کوپنس[3] با سایز ۱ (تا وزن ۲۰۰ میلی گرم)، سایز ۲ (۲۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم)، سایز ۳ (۵۰۰ میلی گرم تا ۲ گرم) و سایز ۴ (۲ تا ۴ گرم) انتخاب گردید. قابل ذکر است که پیش از اجرای آزمایش، ارزش غذایی جیره خشک فوق از لحاظ سطوح چربی، پروتئین و رطوبت مورد سنجش قرارگرفت که به ترتیب شامل مقادیر ۱۵/۴٪، ۵۳٪ و ۹/۸٪ بود.

برای آماده سازی جیره های ۱ و ۲، مقدار پروبیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار توسط ترازوی حساس (METLER مدل AB204-N) وزن شد. مطابق روش مورد استفاده توسط Chang و Liu (۵)، به پروبیوتیک آب مقطر اضافه شد، سپس روی غذا اسپری گردید. جهت آماده سازی جیره‌های ۳ و ۴، به آهن مصرفی آب مقطر اضافه شد، و روی غذا اسپری گردید. در خصوص تیمارهای ۵، ۶، ۷و۸، ابتدا پروبیوتیک و سپس آهن روی غذا اسپری شد. در ضمن به آلوین‌های سه تراف نیز به عنوان تیمار شاهد (۹) (جدول ۱)، غذای پلت اسپری شده با آب مقطر خورانده شد. کلیه غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار داده شد تا آب مخلوط شده با غذا، تبخیر گردد. پس از تبخیر، غذا را دوباره وزن نموده تا به وزن اولیه برسد، در نهایت روغن مایع با نسبت مشخص و یکسانی روی همه غذاها اسپری شد و برای غذادهی استفاده گردید.

میزان کل غذای مورد نیاز برای کلیه تیمارها بر اساس نتایج حاصل از زیست سنجی بچه ماهیان (هر شش روز یک بار) در هر یک از تراف های پرورش، با در نظر گرفتن میانگین دمای آب، و بر اساس جدول استاندارد (۳۰) در نظر گرفته شد. دفعات غذادهی روزانه برای ماهیان تحت آزمایش طبق معادله زیر محاسبه شد (۳۰):

1. Chr. Hansen A/S, Horsholm Denmark
2. $Fe(So_4)_2(7H_2O)$
3. Coppens

www.SID.ir

Archive of SID



معادله (۱):

$\frac{\sqrt{W}}{T^{1/1}} \times ۴۰$ = تناوب غذادهی روزانه (بر حسب ساعت)

W= وزن بدن (گرم)

T= دما (درجه سانتی گراد)

در پایان دوره ۶۰ روزه، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۳۰ عدد از ماهی های هر تکرار به طور تصادفی صید گردید، مراحل بیهوشی توسط تریکائین متان سولفونات ($MS_{222}$) (pH:۷)، با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۲۶) انجام شد، با روش قطع ساقه دمی (۲۶)، ۱ سی سی خون از هر تکرار درون لوله ویال (Eppendorf) آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) ریخته شد. بلافاصله تعداد گلبول های قرمز (۶)، غلظت هموگلوبین (۳۱) و درصد هماتوکریت (۴) آن تعیین شد.

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completery Randomyzed Design) و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) و تست Duncan (۸) به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگین ها مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. اختلافات بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $P<۰/۰۵$ تعیین گردید. کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS ۱۴ مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ۱: جیره های آزمایشی مورد استفاده جهت آلوین ها در تیمارهای مختلف

| تیمار | جیره |
|---|---|
| ۱ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۶\times۱۰^{۹}$ CFU/gr |
| ۲ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/gr |
| ۳ | غذای استاندارد به همراه محلول آهن به مقدار 7 mg Fe/kg |
| ۴ | غذای استاندارد به همراه محلول آهن به مقدار 5 mg Fe/kg |
| ۵ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۶\times۱۰^{۹}$ CFU/gr و محلول آهن به نسبت 7 mg Fe/kg |
| ۶ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۶\times۱۰^{۹}$ CFU/gr و محلول آهن به نسبت 5 mg Fe/kg |
| ۷ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/gr و محلول آهن به نسبت 7 mg Fe/kg |
| ۸ | غذای استاندارد به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/gr و محلول آهن به نسبت 5 mg Fe/kg |
| ۹ | غذای استاندارد (تیمار شاهد: بدون مکمل سازی با پروبیوتیک و آهن) |

## نتایج

### ۱- تعداد گلبول های قرمز خون

در انتهای دوره آزمایش تیمار ۷ حداکثر تعداد گلبول های قرمز را به خود اختصاص داد. لازم به ذکر است که بین تیمار مزبور و تیمار ۵ اختلاف معنی دار وجود نداشت ($P\geq۰/۰۵$). حداقل تعداد گلبول های قرمز به ترتیب متعلق به تیمارهای ۲ و ۱ می باشد، همچنین بین تیمارهای مزبور و تیمار شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P\geq۰/۰۵$) (نمودار ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

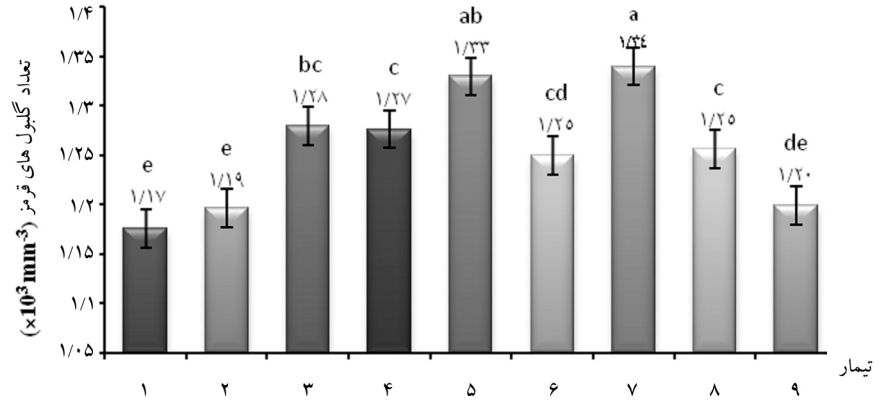


**۲- غلظت هموگلوبین**

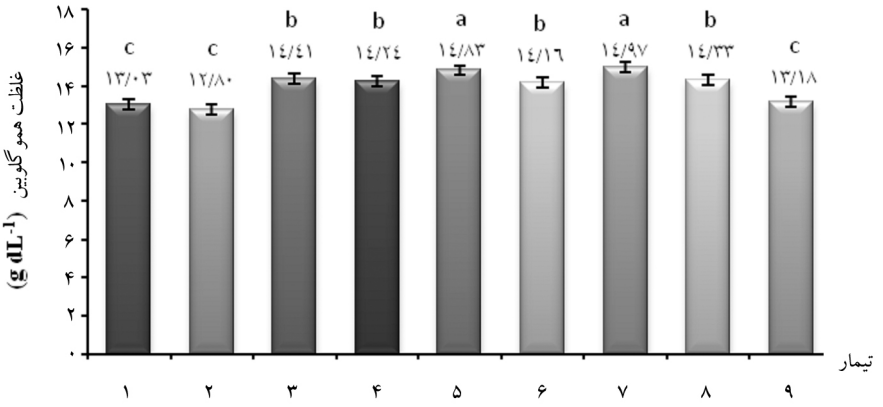
در بین تیمارهای آزمایشی حداکثر میزان هموگلوبین به ترتیب متعلق به دو تیمار ۵ و ۷ بود، که تیمارهای مزبور اختلاف معنی دار آماری با سایر تیمارها داشتند ($P\leq ۰/۰۵$)، به علاوه بین دو تیمار مزبور اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P\geq ۰/۰۵$). حداقل میزان هموگلوبین به ترتیب متعلق به تیمارهای ۹، ۱ و ۲ می باشد که بین سه تیمار مزبور اختلاف معنی دار بدست نیامد ($P\geq ۰/۰۵$) (نمودار ۲).

**۳- درصد هماتوکریت**

بر اساس نمودار۳ حداکثر درصد هماتوکریت به ترتیب متعلق به سه تیمار ۵، ۳ و ۷ می‌باشد، همچنین تیمارهای مزبور دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها می باشند ($P\leq ۰/۰۵$). حداقل درصد هماتوکریت متعلق به تیمار ۲ می‌باشد، که بین تیمار فوق و تیمار ۱ اختلاف معنی دار وجود ندارد ($P\geq ۰/۰۵$) (نمودار ۳).




نمودار۱: میانگین تعداد گلوبولهای قرمز خون بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در انتهای دوره آزمایش

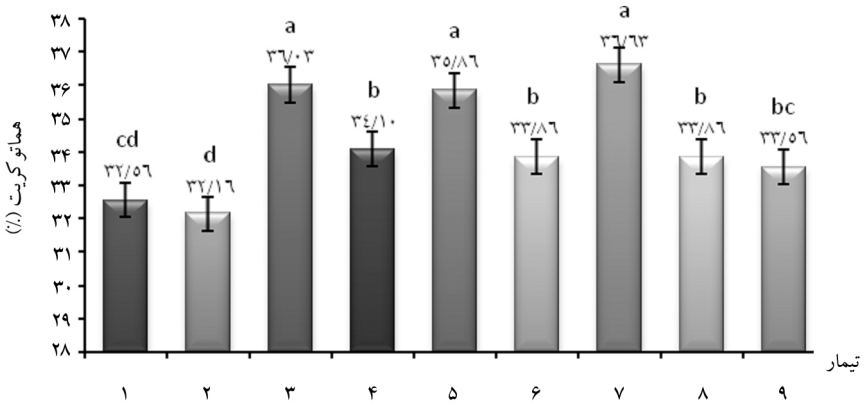



نمودار۲: میانگین غلظت هموگلوبین خون بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در انتهای دوره آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID






نمودار۳: میانگین درصد هماتوکریت خون بچه ماهی ها در انتهای دوره آزمایش ۶۰ روزه [۱۳۸۷] (وجود حروف مشابه نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P\geq ۰/۰۵$)

**بحث**

در این تحقیق افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک به غذای تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش تعداد گلبول های قرمز خون در تیمارهای ۱و۲ نسبت به تیمار شاهد گردید. نتایج بررسی Khattab و همکاران نشان داد که وجود *Psuedomonas* sp. در تیمارهای آزمایشی تیلاپیا، کاهش تعداد گلبول های قرمز را موجب می‌شود (۱۶). Firdaus و همکاران نشان دادند که عدم حضور آهن در رژیم غذایی یک نوع گربه ماهی (*Heteropneustes fossilis*)، باعث کاهش تعداد گلبول های قرمز خون می‌شود (۱۱)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. با توجه به اینکه تقریباً تمامی اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می‌گردد، به هموگلوبین موجود در گلبول های قرمز خون متصل می باشد (۲۰). از این رو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول های قرمز، رابطه ای منطقی می‌باشد. وجود آهن اضافی در جیره غذایی بر میزان هموگلوبین خون تأثیر می‌گذارد، که در نتیجه تیمارهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷و۸ دارای هموگلوبین بیشتری نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای ۱و۲ بودند. حداقل میزان هموگلوبین در تیمارهای ۱و۲ مشاهده شد. در آزمایش Mohan و همکاران غلظت هموگلوبین خون جوجه های گوشتی با افزایش سطوح مختلف پروبیوتیک کاهش یافت که علت آن به خاطر رقابت پروبیوتیک با بدن برای تحصیل اسید فولیک غذا ذکر شده است، به این صورت که اسید فولیک غذا، کمتر در دسترس بدن قرار می‌گیرد و منجر به ایجاد علائم کم خونی می‌گردد (۲۱). در تحقیق حاضر نیز احتمالاً *B. subtilis* و *B. lisheniformis* برای جذب اسید فولیک دارای رقابت فشرده ای بوده و در نتیجه سطح هموگلوبین در تیمارهایی که فقط پروبیوتیک به غذایشان اضافه شده بود، کاهش یافته است. در تحقیق حاضر در تیمارهای ۳ و۴، نسبت به تیمار شاهد هموگلوبین بیشتری مشاهده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به دست آمده از برخی تحقیقات دیگر که اثر آهن را بر میزان هموگلوبین خون بررسی کردند، مطابقت دارد. Lim و همکاران نشان دادند که استفاده از آهن متیونین[1] و سولفات آهن در غذای گربه ماهی

1. Iron Methionin

www.SID.ir

Archive of SID



کانالی (*Ictalurus punctatus*) باعث افزایش میزان هموگلوبین در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد گردید(۱۸). در تحقیق حاضر دو تیمار ۱و۲ دارای کمترین درصد هماتوکریت بودند. Raida و همکاران نشان دادند که استفاده از بیوپلاس ۲- ب در قزل‌آلای رنگین کمان در برابر بیماری *Yersinia ruckeri*، اختلاف معنی داری در هماتوکریت تیمارهای پروبیوتیکی به وجود نمی‌آورد (۲۶). Lim & Klesius نشان دادند که درصد هماتوکریت در گربه ماهی کانالی تغذیه شده با آهن اضافی در غذا، بیشتر می‌باشد (۱۹). در تحقیق حاضر نیز در تیمارهای شامل آهن نسبت به تیمار شاهد و تیمارهایی که فقط پروبیوتیک به غذایشان اضافه شده بود، درصد هماتوکریت بیشتری مشاهده گردید.

در بین تیمارهای آزمایشی تیمار شامل سطح پایین پروبیوتیک ($۱/۲\times۱۰^{۹}$ CFU/gr) و سطح بالای آهن (۷mg/kg)، بهترین تأثیر را بر پارامترهای خونی مورد بررسی در این تحقیق داشت. با توجه به نتایج حاصله می توان اینگونه نتیجه گرفت که در بین دو سطح پروبیوتیک مصرفی، با افزایش سطح پروبیوتیک در غذا به همراه آهن اضافی در غذا، میزان RBC، Hb و Hct افزایش نمی‌یابد، از طرف دیگر وجود باکتری‌های باسیلوس به تنهایی در غذای آلوین قزل‌آلای رنگین کمان موجب کاهش میزان پارامترهای خونی اندازه گیری شده در این تحقیق می گردد. نتایج حاصل در مورد تیمارهایی که غذایشان فقط با پروبیوتیک مکمل سازی شده بود با نتایج بدست آمده توسط Palikova و همکاران، همچنین Khattab و همکاران مطابقت دارد.

**سپاسگزاری**

لازم می دانیم مراتب قدردانی و سپاس خود را از از ریاست محترم مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن و کارکنان آن مرکز و سایر عزیزانی که نقشی در این تحقیق داشته اند ابراز داریم چرا که بدون یاری آنها انجام این تحقیق میسر نبود. همچنین از شرکت کریستین هنسن به دلیل تامین پروبیوتیک مصرفی و راهنمایی در نحوه استفاده از آن سپاسگزاری می نمائیم.

**منابع**

1. Austin, B.; Stuckey, L.F.; Robertson, P.A.W.; Effendi, I. and Griffith, D.R.W., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salminicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 18: 93–96.
2. Bagheri, T.; Hedayati, S.A.; Yavari, V.; Alizade, M. 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*. 8: 43-48.
3. Balcazar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D. and Muzquiz, J.L., 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics*. 19: 239–242.
4. Britton, C.J., 1963. "Disorders of the Blood",9th ed. I. A. Churchill, Ld. London. United Kingdom.
5. Chang, C.I.W. and Liu, W.Y., 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Disseases*. 25: 311-315.
6. Dacie, J.V. and Lewis, S.M., 1984. Practical Haematology., Churchill Living Stone. London.

www.SID.ir

Archive of SID



7. Direkbusarakom, S.; Yoshimizu, M.; Ezura, Y.; Ruangpan, L. and Danayadol, Y., 1998. *Vibrio* spp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *Journal of Biotechnology*. 6**:** 266–267.
8. Duncan, D.B., 1955. Multiple range and multiple (F) test. *Biometrics*. 11: 1- 42.
9. Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 48**:** 149-158.
10. Farzanfar, A.; Lashto Aghaei, G.; Alizadeh, M.; Bayati, M. and Ghorban, R., 2007. Study on growth performance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae with different concentration of probiotic in diet. In: *Proceedings of Aquaculture 2007*, SAN ANTONIO, TEXAS, USA.
11. Firdaus, S.; Jafri, A.K. and Rahman, N., 1994. Effects of iron-deficient diet on the growth and haematological characteristics of the catfish *Heteropueustes fossilis* Bloch. *Journal of aquaculture in the tropics*. Vol: 9. No:3. Pp: 179-185.
12. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
13. Garriques, D. and Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production o f Penaeus vannamei postlarvae in Ecuador. In: Browdy C. L., Hopkins, J. S. (Eds.), Swimming through troubled water.Proceedings of the special session on shrimp farming Sandiego, CA, USA. *The World Aquaculture Society*. Pp: 53-59.
14. Gatesoupe, F.J., 1997. Siderophore production and probiotic effect of Vibrio sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resource*. 10: 239–246.
15. Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K., 2002. Growth and survival of Rohu,*Labeo rohita*(Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. *Acta. Icthology Piscatorial*. 32(1): 83-92.
16. Khattab, Y.A.E.; Shalaby, A.M.E. and Abdel-Rhman, A.A., 2007. Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 28: 74-81.
17. Kurti, P., 2000. Microbial balance and optimal digestion in pigs. *International Pig Topics*. 16: 17- 19.
18. Lim, C.; Sealey, W.M. and Klesius, P.H., 1996. Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society*. Vol: 27. No: 3. Pp: 290-296.
19. Lim, C. and Klesius, P.H., 1997. Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*. Vol: 157, No: 1-2. Pp: 83-93.
20. Michael, M.K. and Nelson, D.L., 2000. Leninger principles of biochemistry. 3rd. ed. Cox.
21. Mohan, B.R.; Kadirvel, S.K.; Natarajan, R. and Bhaskaran, M., 1996. Effect of probiotic supplementation on growth nitrogen utilization and serum cholestrol in broilrs. *Brithish Poulty Science*. 37: 395-401.
22. Naser, N.; Lall, S.P.; Brown, L. and Olivier, G., 1998. Role of dietary iron in immune response and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. 98, Las Vegas, NV (USA).
23. Olafsen, J.A., 1998. Interactions between hosts and bacteria in aquaculture, p. 127–145. In Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms: Research Issues for Biotechnology. European Commission, Brussels, Belgium.
24. Palikova, M.; Navratil, S.; Krejcf, R.; Sterba, F.; Tichy, F. and Kubala, L., 2004. Outcomes of repeated exposure of carp (*Cyprinus carpio* L) to *Cyanobacteria* extract. Acta. Vet. Brno. 73: 259- 265.
25. Prieur, D.; Mevel, G.; Nicolas, J.L.; Plusquellec, A. and Vigneulle, M., 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*. 28: 277–352.


www.SID.ir

Archive of SID



26. Raida, M.K.; Larsen, J.L.; Nielsen, M.E. and Buchmann, K., 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*. 26: 495–498.
27. Reid, R.T.; Live, D.H.; Faulkner, D.J. and Butler, A., 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature*. 366: 455–458.
28. Rorvik, K.A.; Salte, R.; Bentsen, H.B. and Thomassen, M., 1991. Effects of dietary iron and n-3 unsaturated fatty acids (omega-3) on health and immunological parameters in farmed salmon. P: 86.
29. Serrano, P.H., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. 469, 97p.
30. Timmons, M.B.; Ebeling, J.M.; Wheaton, F.W.; Summerfelt, S.T. and Vinci, B.J., 2001. Recirculating aquaculture systems. NRAC.
31. Vankampen, E.J., 1961. Determination of haemoglobin. Clin. Chem. Acta. 5: 719-720.
32. Verschuere, L.; Rombout, G.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 655–671.
33. Vine, N.G.; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2004a. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 231: 145–152.

www.SID.ir