شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰

ص ۶۳۵-۶۴۸

تأثیر پروبیوتیکی باکتری *Pediococcus acidilactici* در شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش و ترکیب بیوشیمیایی کل لاشهٔ بچه‌ماهی گرین‌ترور *Aequidens rivulatus* (Günther, 1860)

❖ **علیرضا نیسی:** کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران
❖ **غلامرضا رفیعی*:** استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران
❖ **محمدعلی نعمت‌اللهی:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران
❖ **سیدهادی رضوی:** استاد گروه علوم صنایع غذایی، دانشکدهٔ مهندسی بیوسیستم دانشگاه تهران

چکیده

در دورهٔ تغذیه‌ای هشت‌هفته‌ای اثر پروبیوتیکی باکتری *Pediococcus acidilactici* در شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات لاشهٔ ماهی گرین‌ترور (green terror) *Aequidens rivulatus* (۰/۳۸۸±۰/۰۰۲۱) در قالب طرحی کاملاً تصادفی بررسی شد. ماهی‌های تهیه‌شده با تراکم ۶۰ قطعه بچه‌ماهی گرین‌ترور به ۹ مخزن ۱۲۰ لیتری فایبرگلاس بیضی‌شکل وارد و روزانه دو بار تا حد سیری تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱ به‌منزلهٔ تیمار شاهد، تیمار ۲ تغذیه‌شده با جیرهٔ غذایی حاوی روغن ماهی و تیمار ۳ تغذیه‌شده با جیرهٔ غذایی حاوی روغن ماهی و باکتری *Pediococcus acidilactici* بودند. بعد از اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی در تیمار ۳ وزن نهایی (۳/۲۲ گرم)، SGR (۳/۶۵ %/day)، FCR (۱/۴۵)، FER (۰/۸۷)، PER (۰/۳۸) نسبت به تیمارهای دیگر بهتر بود ($p<0/05$). میزان مادهٔ خشک (۳۰/۸۱)، چربی (۳۳/۷۳) و انرژی لاشه (۶۲۱۷/۲۰) نیز در تیمار ۳ به طور معنی‌داری در پایان آزمایش افزایش یافت ($p<0/05$). همچنین، اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین و خاکستر در بین تیمارهای آزمایش وجود نداشت ($p<0/05$). در تیمار ۳ میزان آنزیم‌های گوارشی تریپسین (۸۲ /۱ U/mg protein−1)، آمیلاز (۳/۰۴ U/mg protein−1) و لیپاز (۱/۲۴ U/mg protein−1) اختلاف معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<0/05$). بنا بر نتایج این تحقیق باکتری *Pediococcus acidilactici* تأثیر مثبتی در شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی گرین‌ترور دارد و این باکتری را می‌توان در پرورش این گونه ماهی زینتی، به‌منزلهٔ پروبیوتیک، به کار برد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، پروبیوتیک، تجزیهٔ لاشه، شاخص رشد، گرین‌ترور، *Pediococcus acidilactici*.

* نویسندهٔ مسئول تلفن : ۰۹۱۲۴۶۲۲۶۵۳
Email: ghrafiee@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

سیچلیده‌ها به‌منزلهٔ خانواده‌ای مهم و بزرگ در بخش ماهیان زینتی و خوراکی مطرح‌اند. ماهی گرین‌ترور (green terror) *Aequidens rivulatus* یکی از ماهیان زینتی پرطرفدار از این خانواده است. این ماهی در شرایط طبیعی بنتوپلاژیک و دارای رژیم غذایی همه‌چیزخواری است. گرین‌ترور گونهٔ بومی امریکای جنوبی (اکوادور و پرو) است (Kullander (Schaafsma and Groothuis, and Ferraris, 2003 ; 2012. امروزه این ماهی به طور گسترده به‌منزلهٔ ماهی زینتی در کشورهای مختلف تکثیر و پرورش می‌یابد (Gregory, 2005). برای بهبود شرایط تکثیر و پرورش ماهیان زینتی تحقیقات زیادی دربارهٔ چگونگی تغذیه، نوع جیرهٔ غذایی، کیفیت آب، بهبود شرایط بهداشتی و استرس انجام شده است (Ghosh et al., 2008). با توجه به این‌که یکی از اهداف مهم در آبزی‌پروری ارائهٔ محصول با کمترین هزینه و بیشترین بازده است، در جهت ارائهٔ راهکارهای مناسب برای حصول این مهم توجه به باکتری‌های اسید لاکتیک به‌منزلهٔ پروبیوتیک‌های مناسب جلب شده است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی‌اند که می‌توانند از طریق ورود به دستگاه گوارش میزبان سبب بهبود تعادل میکروبی روده، حفظ سلامتی همچنین، افزایش رشد در میزبان شوند (Gatesoupe, 1999).

پروبیوتیک‌ها با هدف‌های گوناگون از جمله افزایش رشد از طریق ترشح آنزیم‌های گوارشی برای هضم بهتر غذا، مقابله با عوامل بیماری‌زا از طریق حذف رقابتی میکروارگانیسم‌های مضر و نیز تحریک سیستم ایمنی در افزایش کارایی و کارکرد زیستی میزبان نقش دارند (Villamil Vandenbergh, 1993 ; et al., 2002). در پژوهش‌های مقدماتی مبنی بر عملکرد پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، توانایی پروبیوتیک در افزایش میزان رشد در حیوانات آبزی اثبات شد (Macey and Lara-Flores et al., 2003 ; Coyne, 2005; Wang and Xu, 2006; Wang, 2007) و نشان داده شد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌منزلهٔ مکمل غذایی نیز به کار روند و از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تأثیر سودمندی در میزبان داشته باشند (Fuller, 1989). امروزه، تعداد زیادی از فراورده‌های پروبیوتیکی به صورت تجاری، به صورت افزودنی به غذا و آب در پرورش ماهی، میگو و دوکفه‌ای‌ها استفاده می‌شوند (Wang et al., 2005).

پروبیوتیک‌ها به طور مستقیم و غیرمستقیم در فلور میکروبی رودهٔ میزبان نیز تأثیرات سودمندی دارند. افزایش باکتری‌های مفید در ضمائم گوارشی با تولید ترکیبات بازدارنده، و با بهبود مورفولوژی دستگاه گوارش، منجر به تأثیرات سودمند در ماهیان می‌شوند (Merrifield et al., 2010).

در مرحلهٔ لاروی کیفیت و کمیت غذای مصرفی نقش مهمی در رفع نیازهای غذایی ماهی دارد و پژوهش‌های بسیاری دربارهٔ ساخت غذا و روند تکاملی دستگاه گوارش به‌خصوص ترشحات آنزیمی انجام شده است. در مرحلهٔ لاروی با توجه به شروع تغذیهٔ فعال پروبیوتیک‌ها اهمیت بسیاری در رشد و بازماندگی لاروها دارند (Tovar-Olafsen, 2001 ; Ramírez et al., 2002).

در این زمینه، بهبود شرایط ترشح آنزیمی دستگاه گوارش از طریق حضور باکتری‌های مفید بسیار مدنظر بوده است (Moriarty, Moriarty, 1996 ;

Archive of SID

www.SID.ir

1998 ; Tovar-Ramírez et al., 2004; Wang and Xu, 2006; Ziaei-Nejad et al., 2006; Castex et al., 2008).

بنابراین، هدف اصلی در این پژوهش امکان کاربرد باکتری *Pediococcus acidilactici* به‌منزلهٔ پروبیوتیک در بهبود شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش در بچه‌ماهی گرین‌ترور *Aequidens rivulatus* تعیین شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیهٔ نمونهٔ باکتری

مکمل غذایی باکتریایی باکتوسل حاوی باکتری *Pediococcus acidilactici* خالص که به صورت پودری است از شرکت پاک‌گستر نمایندگی رسمی لالماند (LALLEMAND) فرانسه تهیه شد. میزان یک گرم باکتری *Pediococcus acidilactici* به ازای هر کیلوگرم جیره همراه با ۲ درصد روغن ماهی به‌منزلهٔ حامل به جیرهٔ مورد نظر اضافه شد (Castex et al., 2008).

۲.۲. تهیهٔ جیرهٔ غذایی

نخست، آنالیز اجزای تشکیل‌دهندهٔ جیره‌های غذایی انجام شد (AOAC, 1990) سپس، اجزای تشکیل‌دهندهٔ جیره‌های غذایی با سطح پروتئین ۴۱ درصد از طریق برنامهٔ جیره‌نویسی لیندو فرموله و تنظیم شد. در ابتدا مواد اولیهٔ تشکیل‌دهندهٔ جیره‌های غذایی طبق فرمول مربوط به هر جیره وزن‌کشی سپس در آسیاب به‌خوبی مخلوط شدند، مخلوط حاصل با آب به صورت خمیر درآمد، خمیر به‌دست‌آمده با چرخ‌گوشت به صورت رشته‌هایی به قطر ۲/۵-۲ میلی‌متر درآمد. برای به دست آوردن جیره‌های غذایی با اندازهٔ مناسب جیره‌ها پس از خشک شدن به ذرات کوچک‌تری خرد شدند (Rawling et al., 2009). جیره‌های غذایی با توجه به تیمارهای آزمایشی شماره‌گذاری و درون پاکت پلاستیکی به یخچال منتقل شدند. اجزای جیرهٔ غذایی استفاده‌شده در این آزمایش و تجزیهٔ تقریبی آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهندهٔ جیرهٔ غذایی و ترکیب نهایی آن

اجزا[1]	۳	۲	۱
پودر ماهی	۴۰	۴۰	۴۰
آرد گندم	۱۵	۱۵	۱۵
سبوس گندم	۱۵/۲۵	۱۵/۲۵	۱۵/۲۵
کنجالهٔ سویا	۱۷	۱۷	۱۷
روغن گیاهی	۷/۹	۷/۹	۷/۹
روغن ماهی	۲	۲	۰
[2] مواد معدنی	۱	۱	۱
[3] ویتامین	۱	۱	۱
[4] ضد قارچ	۰/۵	۰/۵	۰/۵

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهندهٔ جیرهٔ غذایی و ترکیب نهایی آن

اجزا	۳	۲	۱
آنتی‌اکسیدانت[5]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
آلفا سلولز[6]	۰	۰/۱	۲/۱
باکتری	۰/۱	۰	۰
کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
آنالیز بر اساس مادهٔ خشک			
مادهٔ خشک	۹۴/۲۱	۹۴/۱۷	۹۳/۲
پروتئین خام	۴۱/۵۴	۴۱/۳۵	۴۱/۲۹
چربی خام	۱۱/۶۴	۱۱/۶۵	۱۰/۶۷
خاکستر	۱۰/۰۶	۱۰/۴۱	۱۰/۴۹

۱. بر حسب درصد جیره

2.Contained (g kg-1 mix): Contained (g kg-1 mix): MgS04.2H20, 127.5; KCl, 50.0; NaCl, 60.0; CaHPO4, 2H2O, 727.8; FeSO4. 7H2O, 25.0; ZnSO4.7H2O, 5.5 CuSO, 5H2O, 0.785; MnSO4 .4H2O, 2.54; CoSO4.4H2O, 0.478; Ca(IO3)2 . 6H2O, 0.295; CrCl3 ,6H2O, 0.128.

3.Vitamin premix contained the following vitamins (each kg-1 diet): vitamin A, 10 000 IU; vitamin D3 2000 IU; vitamin E, 100 mg; vitamin K, 20 mg; vitamin B1, 400 mg; vitamin B2, 40 mg. vitamin B6 20 mg; vitamin B12, 0.04 mg; biotin, 0.2 mg; choline chloride, 1200 mg; folic acid, 10 mg; inositol, 200 mg; niacin, 200 mg; pantothenic calcium, 100mg.

4.ToxiBan antifungal (Vet-A-Mix, Shenan-doah, IA).

5.Butylated hydroxytoluene (BHT) (Merck, Germany).

6.Sigma, St. Louis, MO, USA.

۳.۲. طرح آزمایش

۵۴۰ قطعه بچه‌ماهی گرین‌ترور (green terror) *Aequidens rivulatus* تهیه و به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. در قالب طرحی کاملاً تصادفی به مدت ۸ هفته تحت ۳ تیمار غذایی شامل: تیمار ۱ تیمار شاهد، تیمار ۲ جیرهٔ غذایی حاوی ۲٪ روغن ماهی و تیمار ۳ جیرهٔ غذایی حاوی روغن ماهی و باکتری *Pediococcus acidilactici* آزمایش انجام شد که برای هر تیمار هر ۳ تکرار در نظر گرفته شد. میزان غذادهی دو بار در روز و تا حد سیری بود. در شروع آزمایش ۶۰ قطعه بچه‌ماهی دارای میانگین وزن ۰/۳۸۸±۰/۰۰۲۱ گرم که از نظر ظاهری فاقد هر گونه عامل بیماری بودند به هر واحد آزمایشی اضافه شدند.

هر واحد آزمایشی از تانک فایبرگلاس ۱۲۰ لیتری با ۶۰ لیتر آب تشکیل شده بود که با هواده مرکزی به صورت شبانه‌روزی هوادهی می‌شد. دمای آب در هر واحد آزمایشی با بخاری برقی ۱۰۰ واتی آبی ترموستات‌دار در کل دورهٔ آزمایشی در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شده بود. ۲۵ درصد آب تانک‌ها به صورت یک روز در میان تعویض می‌شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۴.۲. نمونه‌برداری از ماهیان و اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

در پایان آزمایش وزن‌کشی نهایی صورت گرفت و درصد افزایش وزن (WG%)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) (Misra et al., 2006) نرخ کارایی پروتئین، نرخ کارایی غذا (Bai, 2001)، و بقا (Li et al., 2005) طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

۱۰۰ × (وزن اولیه/ وزن اولیه – وزن نهایی) = درصد افزایش وزن

۱۰۰ × (مدت زمان آزمایش/ (لگاریتم وزن اولیه – لگاریتم وزن نهایی)) = نرخ رشد ویژه

(افزایش وزن کسب‌شده (گرم) / کل غذای خورده‌شده (گرم)) = ضریب تبدیل غذایی

(غذای خورده‌شده (گرم) / افزایش وزن کسب‌شده (گرم)) = (FER) نرخ کارایی غذا

(پروتئین خورده‌شده (گرم) / افزایش وزن کسب‌شده (گرم)) = (PER) نرخ کارایی پروتئین

۱۰۰ × (تعداد ماهیان در شروع آزمایش / تعداد ماهیان زنده در آخر آزمایش) = درصد بقا

۵.۲. آنالیز لاشه

برای آنالیز لاشه از هر تیمار نمونه‌برداری شد (۴ عدد ماهی برای هر نمونه) و نمونه‌ها در آون (HERAEUSINSTRUMENTS مدل D-63450 Hanau) در دمای ۱۰۵ درجه خشک شدند. سپس ماهیان خشک‌شده جمع‌آوری شدند و آنالیز لاشه با استفاده از روش استاندارد انجام شد (AOAC, 1990).

۶.۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های گوارشی

نمونه‌هایی از ضمائم گوارشی ماهیان گرفته شد و در پنج حجم آب مقطر دو بار تقطیر در دمای انجماد هموژنیزه شد. عصاره‌های گرفته‌شده برای ارزیابی آنزیمی استفاده شد. این نمونه‌ها از هموژنیزه کردن لاروها در بافر سرد ۵۰ میلی‌لیتری در اسیدیتهٔ ۸ و به دنبال آن سانتریفیوژ به دست آمدند. فعالیت تریپسین با استفاده از Nα-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) به‌منزلهٔ سوبسترا اندازه‌گیری شد (Tseng et al., 1982). فعالیت لیپاز با استفاده از روش مکلار و چولت (۱۹۸۶) محاسبه شد (Mckellar and Cholette, 1986). این روش به دست ورسا و همکاران (۱۹۸۹) اصلاح شد و در این امر از β-naphtylcaprylate به‌منزلهٔ سوبسترا استفاده شد (Versaw et al., 1989). فعالیت یک واحد لیپاز با استفاده از ۱ میلی‌گرم β-naphtol که در هر یک دقیقه به محیط رها می‌شود اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم BBM، فسفات آلکالین (AP) با استفاده از MgCl2 pnitrophenylphosphate(pNPP) به‌منزلهٔ سوبسترا محاسبه شد (Bessey et al., 1946). ارزیابی فعالیت cytosolic peptidase, leucine-alanine peptidase (leu-ala) با استفاده از leucine-alanine به‌منزلهٔ سوبسترا محاسبه شد (Nicholson and Kim, 1975). فعالیت آنزیمی با اندازه‌گیری مقدار سوبسترای هیدرولیزشده در دقیقه (بر حسب میکرومول) در دمای ۳۷ درجه برای AP، aminopeptidaseNandleu-ala و در دمای ۲۵ درجه برای تریپسین به دست آمد. فعالیت آنزیمی به

Archive of SID

www.SID.ir

صورت فعالیت ویژه (U/mg protein−1) بیان شد. میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد محاسبه شد (Bradford, 1976).

۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام دادن آنالیزها با Arc sin تبدیل شدند. برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها از تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه و برای تعیین سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از آزمون در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری به وسیلهٔ نرم‌افزار SPSS 17 و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 در محیط ویندوز انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های رشد

میانگین وزن انفرادی، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، نرخ کارایی پروتئین، نرخ کارایی غذا بین گروه ۱ و ۳ همچنین، گروه ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). میانگین وزن ماهیان در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).این مقدار در تیمار C بیش از سایر تیمارها بود و در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر ۲/۳۱±۰/۰۲۸، ۲/۳۳±۰/۰۲۲ و ۳/۲۲±۰/۰۳۵ گرم بود (جدول ۲). هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین میانگین وزن رشد انفرادی بین گروه‌های A (۲/۳۱±۰/۰۲۸) و B (۲/۳۳±۰/۰۲۲) وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

ضریب تبدیل غذایی (FCR) در بین تیمارها در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت. به طوری که در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱/۷۴±۰/۰۳۵، ۱/۶۹±۰/۰۱۸ و ۱/۴۵±۰/۰۳۳ بود (جدول ۲). میزان نرخ ویژهٔ رشد SGR در تیمار ۱ (۳/۶۵±۰/۰۱۹) نسبت به تیمارهای ۲ (۳/۰۷۹±۰/۰۲) و ۳ (۳/۰۹±۰/۰۱۶) بیشتر بود همچنین، میزان نرخ ویژهٔ رشد در بین گروه تغذیه‌شده با روغن (۳/۰۷۹±۰/۰۲) و شاهد (۳/۰۹±۰/۰۱۶) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین شاخص‌های رشد (FCR, FER, WG, SGR, PER) و بقا (S%) در ماهی گرین ترور تحت تیمارهای آزمایشی

	(۳)	(۲)	(۱)
وزن ابتدایی	۰/۳۸±۰/۰۱۵^{a}	۰/۳۷±۰/۰۴۳^{a}	۰/۳۸±۰/۰۱۷^{a}
وزن انتهایی	۳/۲۵±۰/۰۶۵^{b}	۲/۳۸±۰/۰۹^{a}	۲/۳۷±۰/۰۲۲^{a}
درصد افزایش وزن	۸۳۰/۹۴±۹/۴۶b	۶۱۴/۴۸±۱۳/۳۸^{a}	۶۱۰/۸۳±۵/۷۹^{a}
(SGR)نرخ رشد ویژه	۳/۵۳±۰/۰۲^{b}	۳/۰۲±۰/۰۶^{a}	۳/۰۱±۰/۰۱۵^{a}
(FCR)ضریب تبدیل غذایی	۱/۴۵±۰/۰۱۱^{a}	۱/۷۱±۰/۰۵۳^{b}	۱/۷۴±۰/۰۳۱^{b}
نرخ کارایی غذا (FER)	۰/۸۷±۰/۰۱۰^{b}	۰/۸۳±۰/۰۲۳^{a}	۰/۸۳±۰/۰۱۲^{a}
(PER) نرخ کارایی پروتئین	۰/۳۸±۰/۰۱۵^{a}	۰/۳۷±۰/۰۴۳^{a}	۰/۳۸±۰/۰۱۷^{a}
درصد بقا	۱۰۰±۰/۰۰^{a}	۹۸/۶۶±۲/۳۰^{a}	۹۹/۳۳±۱/۱۵^{a}

مقایسهٔ میانگین شاخص های رشد و بازماندگی در ماهی گرین ترور تیمارشده با مکمل‌های غذایی میکروبی

اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$)

Archive of SID

www.SID.ir

نرخ کارایی غذا (FER) در تیمار ۳ (۰/۸۷±۰/۰۱۰) نسبت به تیمارهای ۱ (۰/۸۳±۰/۰۱۲) و ۲ (۰/۸۳±۰/۰۲۳) به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$). نتایج نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین نرخ کارایی پروتئین (PER) در تیمار ۳ (۰/۳۸±۰/۰۱۵) نسبت به تیمارهای ۱ (۰/۳۸±۰/۰۱۷) و ۲ (۰/۳۷±۰/۰۴۳) وجود ندارد ($p>0/05$). همچنین، نتایج نشان داد که درصد بقا بین تیمارهای مختلف (۱، ۲ و ۳) تفاوت معنی‌داری ندارد ($p>0/05$) (جدول ۲).

۲.۳. آنزیم‌های گوارشی

میزان تریپسین، آمیلاز و لیپاز در تیمارهای ۱ و ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری را در پایان آزمایش در دستگاه گوارش ماهیان نشان داد ($p<0/05$). بیشترین میزان آمیلاز (۳/۰۴±۰/۰۷۵) در تیمار ۳ دیده شد و کمترین میزان آن (۲/۴۸±۰/۰۸۵) مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۳). بیشترین میزان لیپاز (۱/۲۴±۰/۰۸۹) و کمترین میزان لیپاز (۰/۹۳±۰/۰۷۷) به ترتیب مربوط به تیمار ۳ و شاهد بود (جدول ۳).

همچنین، نتایج نشان داد که میزان تریپسین در تیمارهای ۳ (۱/۸۲±۰/۰۶۳) و ۱ (۱/۳۲±۰/۰۳) به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را دارا بود.

۳.۳. آنالیز لاشه

میانگین تقریبی آنالیز لاشهٔ ماهی گرین‌ترور در جدول آمده است. تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز لاشه نشان داد که اختلاف بین انرژی، چربی و مادهٔ خشک در بین تیمار ۱ و ۳ همچنین، بین تیمارهای ۲ و ۳ معنی‌دار بود ($p<0/05$). در بین تیمارهای ۱ و ۲ به ترتیب میزان چربی و مادهٔ خشک ((۲۸/۰۹±۰/۵۴)، (۲۹/۶۷±۱/۳۳)) و ((۲۸/۹۱±۰/۴۵)، (۳۰/۴۷±۱/۶۰)) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$).

اختلاف معنی‌داری بین پروتئین و خاکستر در همهٔ تیمارها وجود نداشت ($p>0/05$) (جدول ۴). بیشترین میزان انرژی لاشهٔ ماهیان مربوط به تیمار ۳ (۶۲۱۷/۲۰±۵۷/۳۶) و کمترین میزان انرژی لاشه مربوط به تیمار ۱ (۵۶۲۶/۹۰±۹۲/۷۸) بود. بیشترین میزان چربی لاشهٔ ماهیان (۳۳/۷۳±۰/۵۰) مربوط به تیمار ۳ و کمترین میزان آن (۲۹/۶۷±۱/۳۳) مربوط به تیمار شاهد بود. بیشترین وزن مادهٔ خشک (۳۰/۸۱±۰/۴۷) مربوط به تیمار ۳ و کمترین آن (۲۸/۰۹±۰/۵۴) مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۴).

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و تریپسین) در ماهی گرین ترور تحت تیمارهای آزمایشی

	(۳)	(۲)	(۱)
آمیلاز (U/mg protein−1)	۳/۰۴±۰/۰۷۵^{b}	۲/۶۵±۰/۰۱۰ ^{a}	۲/۴۸±۰/۸۵^{a}
لیپاز (U/mg protein−1)	۱/۲۴±۰/۰۸۹ ^{b}	۱/۰۲±۰/۰۹۲ ^{a}	۰/۹۳±۰/۰۷۷ ^{a}
تریپسین (U/mg protein−1)	۱/۸۲±۰/۰۶۳^{b}	۱/۳۸±۰/۰۲^{a}	۱/۳۲±۰/۰۳^{a}

مقایسهٔ میانگین شاخص های رشد و بازماندگی در ماهی گرین ترور تیمارشده با مکمل‌های غذایی میکروبی اعداد (میانگین ± SD)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. مقایسهٔ میانگین تجزیهٔ تقریبی لاشه ماهی (مادهٔ خشک، پروتئین، چربی، خاکستر و انرژی) گرین ترور تغذیه‌شده با تیمارهای آزمایشی

	۳	۲	۱
مادهٔ خشک	۳۰/۸۱±۰/۴۷^{b}	۲۸/۹۱±۰/۴۵^{a}	۲۸/۰۹±۰/۵۴^{a}
پروتئین	۵۴/۳۷±۰/۷۹^{a}	۵۳/۰۳±۱/۴۹^{a}	۵۲/۶۸±۰/۳۷^{a}
چربی	۳۳/۷۳±۰/۵۰^{b}	۳۰/۴۷±۱/۶۰^{a}	۲۹/۶۷±۱/۳۳^{a}
خاکستر	۱۳/۵۰±۰/۸۱^{a}	۱۳/۰۶±۰/۸۳^{a}	۱۳/۰۰±۰/۱۷^{a}
انرژی	۶۲۱۷/۲۰±۵۷/۳۶^{c}	۵۸۸۶/۵۰±۱۷/۲۱^{b}	۵۶۲۶/۹۰±۹۲/۷۸^{a}

مقایسهٔ میانگین شاخص های رشد و بازماندگی در ماهی گرین ترور تیمارشده با مکمل‌های غذایی میکروبی
اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دارند ($P < ۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر استفاده از پروبیوتیک تجاری پدیوکوکوس (تیمار ۳) در جیرهٔ ماهی زینتی گرین‌ترور باعث افزایش درصد افزایش رشد (۶۳۰/۹۴) و نرخ رشد ویژه (۳/۶۵)، ضریب تبدیل غذایی (۱/۴۵) و کارایی غذا (۰/۸۷) و پروتئین (۰/۳۸) در ماهیان نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ شد. تأثیرات سودمند پروبیوتیک‌ها در شاخص‌های رشد و کارایی غذا از سوی محققان مختلف در آبزیان نشان داده شده است (Ghosh et al., Gatesoupe, 2002 ; 2003; Venkat et al., 2004).

بیان شده است که استفاده از باکتری *P.acidilactici* در جیرهٔ غذایی ماهی *Pollachius pollachius* باعث افزایش رشد و بازماندگی می‌شود، Gatesoupe این افزایش رشد را در نتیجهٔ افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه بهبود ضریب تبدیل غذایی دانسته است (Gatesoupe, 2002). همچنین استفاده از باکتری *P.acidilactici* در جیرهٔ غذایی میگوی *Litopenaeus stylirostris* باعث افزایش رشد (بیومس ۲۷۰۶ گرم تیمار پروبیوتیک در برابر ۲۴۰۸ گرم تیمار کنترل) و ضریب تبدیل غذایی (ضریب تبدیل غذایی ۰۵ /۲ تیمار پروبیوتیک در برابر ۲/۲۸ تیمار کنترل) شده است (Castex et al., 2008)، که نتایج این دو پژوهش مشابه نتایج پژوهش حاضر است.

Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) با به‌کارگیری باکتری *P.acidilactici* در جیرهٔ ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) رشد (وزن ۲۵۹ گرم تیمار پروبیوتیک در برابر ۲۵۳ گرم تیمار کنترل) معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد ملاحظه نکردند (Ferguson et al., 2010). بنا بر نتایج آنان میزان ضریب تبدیل غذایی تغییر معنی‌داری نکرده است (ضریب تبدیل غذایی ۱/۱۹ تیمار پروبیوتیک در برابر ۱/۲۵ تیمار کنترل). در این تحقیق میزان آنزیم‌های گوارشی اندازه‌گیری نشد، اما با توجه به نتایج می‌توان گفت که میزان هضم در تیمار پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد تغییری نکرده است که دلیل این نبود تفاوت می‌تواند ناشی از تأثیر نداشتن باکتری در میزان آنزیم‌های گوارشی باشد، تفاوت در داده‌های این پژوهش با نتایج فوق می‌تواند به دلیل تفاوت در

Archive of SID

www.SID.ir

نوع استفاده از باکتری، شرایط آزمایشگاهی همچنین، گونهٔ ماهی متفاوت در آزمایش باشد (Lara-Flores et al., 2003).

تحقیقات دربارهٔ سایر پروبیوتیک‌ها نشان داده است که استفادهٔ چندگونه‌ای باکتری جنس *Basillus* spp. در جیرهٔ لارو ماهی سیم دریایی باعث افزایش رشد شد (Avella et al., 2010). Zhou و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش رشد در نتیجهٔ استفاده از پروبیوتیک‌های *Bacillus coagulans* B16 (۳۳/۰۵ گرم) و *Rhodopseudomonas palustris* G06 (۳۲/۰۵ گرم) حاصل شد که این مقدار افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار کنترل (۲۷/۱۵) در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) نشان می‌دهد (Zhou et al., 2010). این تحقیق با تحقیق Ferguson و همکاران (۲۰۱۰)، که هر دو از ماهی تیلاپیا استفاده کرده بودند، تفاوت داشت؛ یک علت این تفاوت را می‌توان مربوط به گونهٔ باکتری متفاوت استفاده‌شده در دو تحقیق دانست. اندازهٔ متفاوت ماهی استفاده‌شده در دو پژوهش را می‌توان به‌منزلهٔ دلیل دیگر تطابق نداشتن نتایج دو پژوهش فوق در نظر گرفت. Ferguson et al., (2010) از ماهی با وزن بیشتر در مقایسه با Zhou et al., (2010) استفاده کرده بودند. Ghosh et al., (2008) با اضافه کردن چهار غلظت *Bacillus subtilis* در آب ماهی‌های چهار گونه ماهی زینتی *Poecilia reticulata*، *Poecilia sphenops*، *Xiphophorus helleri* و *Xiphophorus maculatus* نشان دادند که فاکتورهای رشد و بقا در همهٔ تیمارها نسبت به تیمار شاهد بالاتر است. تغذیهٔ ماهی کراکر زرد (*Larimichthys crocea*) با جیرهٔ حاوی *Bacillus subtilis* باعث بهبود معنی‌دار ضریب رشد ویژه و نرخ کارایی غذا شد (Ai et al., 2011) که این نتایج نشان می‌دهد باکتری موجود در جیره بر میزان کارایی غذا تأثیرگذار است و این باعث افزایش ضریب رشد ویژه شده است که این نتایج با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد.

رشد میگوی *Macrobrachium rosenbergii* با استفاده از دو باکتری *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus sporogenes* بهبود یافت (Venkat et al., 2004). همچنین، تغذیهٔ میگوی *Penaeus indicus* با غلظت‌های مختلفی از باکتری *Lactobacillus plantarum* نشان داد که با افزایش غلظت باکتری میزان رشد میگو افزایش پیدا کرده است که در تیمار تغذیه‌شده با باکتری با غلظت (10^6 CFU) رشد (۰/۰۲۳ گرم) بیشترین میزان را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد که این مقدار در مقایسه با تیمار کنترل (۰/۰۱۴ گرم) از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/05$) (Uma et al., 1999). در تحقیق Uma و همکاران ضریب تبدیل غذایی و سایر فاکتورهای غذایی محاسبه نشده است، اما با افزایش غلظت باکتری میزان رشد افزایش پیدا کرده است. با توجه به این‌که با افزایش غلظت باکتری میزان رشد افزایش پیدا کرده است این افزایش را می‌توان ناشی از تأثیر باکتری در افزایش رشد دانست. پروبیوتیک *Bacillus* spp. در پرورش کپورماهیان هندی باعث افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی شد (Ghosh et al., 2003; Swain et al., 1996). بیان شده است که این افزایش می‌تواند ناشی از افزایش هضم در اثر استفاده از باکتری باشد (Ghosh et al., 2003).

در پژوهش‌های مختلف تأثیر باکتری در افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش و از آن طریق تأثیر در هضم و جذب موجود زنده به‌منزلهٔ یکی از علل افزایش رشد تأیید شده است (Ding et al., 2004 ; Castex et al., 2008; Zhou et al., 2009).

باکتری‌های پروبیوتیک معمولاً از دو طریق باعث افزایش محتوی آنزیمی ضمائم گوارشی می‌شوند، یکی از طریق تحریک دستگاه گوارش میزبان به ترشح آنزیم با باکتری و دیگری تولید آنزیم از طریق خود باکتری که می‌تواند باعث افزایش میزان آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش موجود شود. افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی باعث بهبود هضم و در نتیجه جذب بهتر مواد غذایی و در نتیجه منجر به افزایش کارایی غذایی موجود سپس رشد بیشتر موجود می‌شود (Moriarty, 1998 Moriarty, 1996 ; Ding et al., 2004; Ziaei-Nejad et al., 2006;).

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری *P.acidilactici* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) شده است. تحقیقات کمی دربارهٔ تأثیر باکتری اسید لاکتیک *P.acidilactici* در افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آبزیان صورت گرفته است. Castex et al., (2008) با استفاده از باکتری *pediococcus acicdilactici* در تغذیهٔ میگوی *Litopenaeus stylirostris* افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را مشاهده کردند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

دربارهٔ تأثیر گونه‌های دیگر باکتری اسید لاکتیک در فعالیت آنزیم‌های گوارشی آبزیان پژوهش‌هایی صورت گرفته است. Ziaei-Nejad et al., (2006) نشان دادند که اضافه کردن باکتری پروبیوتیکی *Bacillus* spp. به جیرهٔ میگوی *Fenneropenaeus indicus* می‌تواند باعث افزایش آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) و رشد شود. استفاده از مخمر زندهٔ *Debaryomyces hansenii* در جیرهٔ باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) باعث افزایش بقا، شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، تریپسین و لیپاز) شد (Tovar-Ramírez et al., 2004). فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوی *Litopenaeus vannamei* در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (Tseng et al., 2009). در ماهی کپور نشان داده شد که باکتری *Bacillus* spp. می‌تواند در فعالیت‌های اختصاصی آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در بچه‌ماهیان تأثیر معنی‌داری داشته باشد (Wang and Xu, 2006)، که نتایج این مطالعات با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد و این را می‌توان به تأثیر باکتری در افزایش آنزیم‌های گوارشی نسبت داد. با مقایسهٔ نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌ها که نتایج مشابهی داشتند می‌توان بیان کرد که در نتیجهٔ استفاده از باکتری *P.acidilactici* میزان آنزیم‌های گوارشی افزایش پیدا کرده که این سبب کاهش ضریب تبدیل غذایی شده است. در اثر افزایش آنزیم‌های گوارشی و افزایش هضم و جذب جیرهٔ غذایی مورد استفاده، رشد در تیمارهای تغذیه‌شده با باکتری *P.acidilactici* افزایش یافته است.

گزارش شده است که تغییر در میزان پروتئین و چربی لاشهٔ ماهی می‌تواند در نتیجهٔ تغییر در ترکیب غذایی آبزیان باشد (Fauconneau, Smith, 1981 ; 1984; Soivio et al., 1989; Abdel-Tawwab et al., 2006).

نتایج تجزیهٔ لاشهٔ ماهیان این آزمایش نشان داد

Archive of SID

www.SID.ir

که استفاده از پروبیوتیک در جیره منجر به تغییر ترکیبات لاشه از جمله چربی، مادهٔ خشک و انرژی می‌شود. پژوهشی دربارهٔ بررسی اثر باکتری *P.acidilactici* در لاشهٔ ماهیان وجود ندارد، اما نشان داده شده است که تغذیهٔ میگوی *Litopenaeus vannamei* با جیرهٔ حاوی باکتری *bacillus* spp. باعث تغییر معنی‌دار میزان پروتئین و خاکستر لاشه در تیمارهای مختلف نشده است، اما اثر آن در میزان چربی لاشه مثبت گزارش شده است (Tseng et al., 2009). علت نبود تغییر در میزان پروتئین لاشه را می‌توان بر اثر محتوی نوکلئوتیدی یکسان برای سلول‌های ماهی در نظر گرفت که برای همهٔ سلول‌ها تقریباً برابر است.

در تحقیقی دربارهٔ ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) نشان داده شد که استفاده از پروبیوتیک تجاری Alchem Poseidon منجر به افزایش معنی‌دار چربی لاشه می‌شود. در حالی که میزان پروتئین لاشه در ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (Taoka et al., 2006)، که این با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. افزایش میزان چربی لاشه می‌تواند بر اثر افزایش آنزیم‌های گوارشی تغییر کند (Taoka et al., 2006). بعد از هضم و جذب جیرهٔ غذایی بخشی از مواد غذایی قابل جذب صرف متابولیسم، رشد، تنفس، تولیدمثل و سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی می‌شود و بخش اضافی آن به صورت چربی ذخیره می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان چربی در این تحقیق بر اثر افزایش آنزیم‌های گوارشی افزایش یافته است و در نتیجهٔ این افزایش، مواد غذایی قابل جذب دردسترس افزایش یافته و این سبب افزایش چربی لاشه شده است.

با مقایسهٔ نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌ها شاید بتوان چنین نتیجه‌گیری کرد که استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* می‌تواند باعث افزایش فعالیت باکتری مفید روده از طریق افزایش آنزیم‌های گوارشی شود و با جایگزینی در میکروویلی‌های روده و با عملکرد فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای منجر به بهبود رشد ماهی شود. بنابراین در این پژوهش نشان داده شد که باکتری *Pediococcus acidilactici* تأثیر مثبتی در شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی گرین‌ترور (green terror) *Aequidens rivulatus* دارد و این باکتری را می‌توان در پرورش این گونه ماهی زینتی در بهبود شاخص‌های رشد و هضم غذا به کار برد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همهٔ کسانی که در به ثمر رسیدن این مقاله به ما یاری رساندند از جمله مسئولان آزمایشگاه شیلات، مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکدهٔ صنایع غذایی دانشگاه تهران، اساتید محترم و دانشجویان گرامی تشکر و قدردانی را داریم.

Archive of SID

www.SID.ir

References

[1]. Abdel-Tawwab, M., Khattab, Y.A.E., Ahmad, M.H., Shalaby, A.M.E., 2006. Compensatory growth, feed utilization, whole-body composition and hematological changes in starved juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Appl. Aquac 18, 17–36.

[2]. Ai, Q., Xu ,H., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Zhang, W., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture 317, 155–161.

[3]. AOAC, 1990. Official Methods of Analyses, 15th edition. Inc., Arlington, VA, p.

[4]. Avella, M.A., Gioacchini, G., O, D., Makridis, P., Bracciatelli, C., Carnevali, O., 2010. Application of multi-species of Bacillus.sp in sea bream larviculture. Aquaculture 305, 12–19.

[5]. Bai, S.C., 2001. Requirements ofi-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rockfish, Sebastes schlegeli (Hilgendorf). Ascorbic acid in aquatic organisms. status and perspectives, 69.

[6]. Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem 164, 321-329.

[7]. Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding .

[8]. Anal. Biochem 72, 248-254.

[9]. Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L., Schmidely, P., Mariojouls, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Aquaculture 275, 182–193.

[10]. Ding, X., Li, Z.J., Chen, Y.Q., Lin, H.Z., Yang, Y.Y., Yang, K., 2004. Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Pennaus vannamei*. J. Fish. Sci. China 11, 580-584.

[11]. Fauconneau, B., 1984. The measurements of whole body protein synthesis in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). Comp. Biochem. Physiol 78, 845-850.

[12]. Ferguson, R., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balca´zar, J.L., Davies, S.J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Appl. Microbiol 109, 851-862.

[13]. Fuller, R., 1989. A review: probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol 66, 365–378. .

[14]. Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147 165.

[15]. Gatesoupe, F.J., 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. Aquaculture 212, 347-360.

[16]. Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *Bacillus circulans*, in formulated diets for rohu, *Labeo rohita*, fingerlings. Israeli J. Aquacult 55.,13-21

[17]. Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes Aquaculture nutrition 14, 289-299.

[18]. Kullander , C.J., Ferraris, J., 2003. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre press, Brasil, p.

Archive of SID

www.SID.ir

[19]. Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzm´an-M´endez, B.E., 2003. Use of the bacteria Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216, 193–201.

[20]. Li, P., Burr, G.S., Goff, J., Whiteman, K.W., Davis, K.B., Vega, R.R., Neill, W.H., Gatlin III, D.M., 2005. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture Research 36, 1120-1127.

[21]. Macey, B.M., Coyne, V.E., 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed Haliotis midae through probiotic treatment .Aquaculture 245, 249–261.

[22]. Mckellar, R.C., Cholette, H., 1986. Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* spp. in skim milk with the beta-naphthyl caprylate assay

[23]. J. Dairy Res 53, 301.

[24]. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A ,.Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bøgwald, J., Castex, M., Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302, 1-18.

[25]. Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary [beta]-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture 255, 82-94.

[26]. Moriarty, D.J.W., 1996. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. Info. Fish Int 4.۳۳–۲۹ ,

[27]. Moriarty, D.J.W., 1998 Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351–358.

[28]. Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. Anal. Biochem 63.۱۱۷-۱۱۰ ,

[29]. Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture 200, 223–247.

[30]. Rawling, M., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2009. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. Aquaculture 294, 118-122.

[31]. Schaafsma, S.M., Groothuis, T.G.G., 2012. Sex-specific effects of maternal testosterone on lateralization in a cichlid fish. Animal Behaviour 83, 437-443.

[32]. Smith, M.A.K ,.1981 .Estimation of growth potential by measurement of tissue protein synthetic rates in feeding and fasting rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. fish biol 19, 213-220.

[33]. Soivio, A., Niemisto, M., Backstrom, M., 1989. Fatty acid composition of *Coregonus muksun* Pallas: changes during incubation, hatching, feeding and starvation. Aquaculture 79, 163-168.

[34]. Swain, S.K., Rangacharyulu, P.V., Sarkar, S., Das, K.M., 1996. Effect of a probiotic supplement on growth, nutrient utilization and carcass composition in mrigal fry. J. Aquacult 4, 29–35.

[35]. Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, C.S., Lee, W.J., Yuge, K., Koshio, S., 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fish. Sci 2, 310–321.

[36]. Tovar-Ramírez, D., Zambonino, I.J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. Aquaculture 2427-415., 34.

Archive of SID

www.SID.ir

[37]. Tovar-Ramírez, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez- Juárez, R., Lésel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 204, 13-123.

[38]. Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Liu, C.H., 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Aquaculture 26, 339-344.

[39]. Tseng, H.C., Grendell, J.H., Rothman, S.S., 1982. Food, deodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. Am. J. Physiol 243.

[40]. Uma, A., Abraham, T.J., Sundararaj, V., 1999. Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. Indian J. Fish 46, 367-373.

[41]. Vandenbergh, P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev 12, 221–238.

[42]. Venkat, H.K., Narottam, P.S., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research 35, 501–507.

[43]. Versaw, W.K., Cuppett, S.L., Winters, D.D., Williams, L.E., 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci 54, 1557-1558.

[44]. Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B., 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). Clin. Diagn .Lab. Immunol 9, 1318–1323.

[45]. Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 269, 259–264.

[46]. Wang, Y.B., Xu, Z.R., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim. Feed Sci.Technol 127, 283-292.

[47]. Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S., 2005. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. Fish. Sci 71 ,1034-1039.

[48]. Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W., 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish physiology and biochemistry 36, 501--509.

[49]. Zhou, X.X., Wang, Y.B., Li, W.F., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287 349-353.

[50]. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., 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 252, 516–520.

Archive of SID

www.SID.ir