

تاثیر مصرف خوراکی شکل میکروانکپسوله *Enterococcus faecium* بر روی فاکتورهای سلامت، رشد، تغذیه و فلور باکتریایی روده در قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*)

آرمین عابدیان امیری^۱، قباد آذری تاکامی^{۱*}، محمد افشار نسب^۱، و دود رضویلر^۲

۱. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و

تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*Takami85@hotmail.com: نویسنده مسئول

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲

چکیده

در این مطالعه تاثیرات دو جیره حاوی پروبیوتیک *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 بر روی فاکتورهای رشد، مصرف غذا، میزان کلونیزه شدن در روده و تاثیراتش بر روی سلامت و زنده‌مانی در قزل آلی رنگین کمان جوان مورد مطالعه قرار گرفت. ۲۷۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی $35/6 \pm 3/8$ گرم بعد از ۲۰ روز دوره قرنطینه به ۳ گروه کاملاً تصادفی (هر گروه ۹۰ قطعه) در سه تکرار (۳۰ قطعه در هر حوضچه) تقسیم شدند. گروه ۱ شامل جیره حاوی *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 (با لوگ $8/4$ CFU g⁻¹) به شکل میکروانکپسوله با آلزینات سدیم و گروه ۲ شامل جیره حاوی *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 (با لوگ 9 CFU g⁻¹) به شکل میکروانکپسوله با آلزینات سدیم و گروه شاهد حاوی جیره پایه بودند. در پایان ۴ و ۸ هفته تغذیه، میزان وزن نهایی، طول کل، درصد افزایش وزن، نرخ رشد روزانه، نرخ بازده پروتئینی و درصد بازماندگی در گروه‌های حاوی پروبیوتیک افزایش و ضریب تبدیل غذایی (%) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. بعد از ۴ هفته تیمار ۲ بالاترین میزان در شاخص‌های رشد، کارایی غذایی و سلامت و افزایش درصد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده در بین تیمارهای پروبیوتیک و گروه کنترل را نشان داد. در ۸ هفته تیمارهای ۱ و ۲ میزان بهبود وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد روزانه، طول کل، نرخ بازده پروتئینی (%)، درصد باکتری‌های اسید لاکتیک در روده و زنده‌مانی (%)/افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان دادند ($P < 0.05$). در ۸ هفته، میزان وزن نهایی، درصد افزایش وزن و نرخ بازده پروتئینی (%)/ در تیمار ۱ افزایش معنی‌دار و ضریب تبدیل غذایی کاهش معنی را نسبت به تیمار ۲ و گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$).

واژگان کلیدی: قزل آلی رنگین کمان، *انتروکوکوس فسیوم*، میکروانکپسوله، شاخص‌های رشد و سلامت، فاکتور تغذیه

مقدمه

عنوان یک گونه مهم پرورشی در صنعت آبی‌پروری مطرح است (فدایی‌فرد، ۱۳۹۵). ایران در سال ۲۰۱۳ عنوان بزرگترین تولیدکننده ماهی قزل آلی رنگین کمان در آب شیرین در جهان (با تولیدی معادل ۱۴۳۹۱۷ تن در سال) را به‌خود اختصاص داد (Kalbassi et al., 2013). اما با افزایش مشکلات در مدیریت آب و غذا و همچنین بروز بیماری در صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور تولید به میزان ۱۷۴۰۲ تن در سال ۲۰۱۴ نسبت به سال قبل از آن، کاهش یافت (Baba Alian et al., 2014;)

جهان در سال ۲۰۱۱ به نقطه عطف جدیدی در تکامل رژیم غذایی انسان رسید. در این سال و برای نخستین بار در تاریخ مدرن، تولید ماهی پرورشی جهان از تولید گوشت گاو پیشی گرفت. این شکاف در سال ۲۰۱۲ افزایش یافته و تولید آبی‌پروری به ۶۶ میلیون تن رسید (Rumpold and Schlüter, 2013). ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) به علت داشتن قابلیت بسیار خوب برای پذیرش غذای دستی و پرورش مصنوعی و سرعت رشد قابل قبول به

مواد و روش کار

نوع روش تحقیق

روش تحقیق در این بررسی از نوع مطالعه میدانی (Field Experiment) و آزمایشگاهی (Laboratory Experiment) استفاده شد.

محل انجام تحقیق

مطالعه میدانی این تحقیق در محل کارگاه خصوصی پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (معروف به پرورش ماهی آقای رضانی) واقع در کیلومتر ۴، جاده آمل- محمودآباد، استان مازندران، ایران انجام شد. طول و عرض جغرافیایی محل مزرعه فوق‌الذکر به ترتیب، $36^{\circ} 36' 01.51''$ شمالی و $52^{\circ} 16' 40.06''$ شرقی و ارتفاع از سطح دریا معادل ۱۱- متر بود. مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران انجام پذیرفت.

بررسی عوامل فیزیکی و شیمیایی آب

پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH، هدایت الکتریکی (EC) و غلظت کل ذرات معلق (TDS) با استفاده از دستگاه ملتی پارامتر، دستگاه آنالایزر (HQ40d, Hach®) (USA) دو بار در روز در ساعات ۸ صبح و ۸ غروب اندازه گیری و در فرم‌های مربوطه ثبت گردید.

حیوانات مورد بررسی

ابتدا تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان "*Oncorhynchus mykiss Walbaum*" با وزن متوسط (انجراف معیار \pm میانگین) $35/6 \pm 3/8$ گرمی به‌ظاهر سالم انتخاب شدند. سپس جهت سازگاری ماهیان با شرایط جدید محیطی و اطمینان از سالم بودن ماهیان انتخابی به مدت ۲۰ روز با غذای کنسانتره (EXG1) (تولید شرکت کیمیاگستران تغذیه، شهرکرد، ایران) مورد استفاده برای تغذیه ماهیان قزل‌آلا، تغذیه گردیدند. پس از اطمینان از سالم بودن و سازگار شدن (adaptation) ماهیان با

این امر در زمانی رخ داد که ایران قصد دارد در راستای برنامه‌ی توسعه‌ی پنج ساله‌ی ششم کشور، میزان تولید قزل-آلای رنگین‌کمان خود را به ۲۱۲ هزار تن در سال ۲۰۲۰ برساند (FAO, 2016).

امروزه استفاده از زیست‌پارها (probiotics) به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده (Live microorganisms) با یک دوز کافی به‌منظور اعمال تاثیرات مفید در میزبان مورد استقبال عمومی دست اندرکاران صنعت خوراک در دنیا قرار گرفته‌است (FAO, 2006). نحوه عمل زیست‌پارها بر آبزیان به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم می باشد. در حالت اول با تغییر در تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش موجود آبی، باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شده و با ترشح ویتامین، مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب رشد می گردند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳). در بین زیست‌پارها، *E. faecium* به‌علت توانایی کاهش pH به ۵/۵، تولید پراکسید هیدروژن، توانایی شکستن پروتئین‌ها و تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط روده بسیار سریع در لیست بازار فروش زیست‌پارها وارد شود (Juven and Pierson, 1996؛ Tomás؛ 2004 Cambell-Macbride, et al., 2004).

از طرفی عمل ریزپوشانی (microencapsulation) در صنایع غذایی تکنیکی نسبتاً جدید می‌باشد و هدف از آن حفظ ویژگی‌های زیستی ترکیب در طول پروسه تولید و همچنین در زمان نگهداری تلقی می‌گردد (Zuidam and Nedović, 2010). در این تحقیق سعی شد اثرات خوراکی *Enterococcus faecium* سویه‌ی بومی IR5 به شکل ریزپوشانی شده بر روی شاخص‌های رشد، سلامت و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان در طی هشت هفته تغذیه مورد مطالعه قرار گیرد.

ریزپوشانی

جهت میکروانکپسوله کردن *E. faecium* سویه IR5 از روش اکستروژن (extrusion) استفاده شده و مواد مورد استفاده جهت انجام این فرآیند نیز شامل آلژینات سدیم (Sodium Alginate) (Sigma, Sigma-Aldrich, ۲٪ (Na₆O₇H₆C) (St Louis, MO, USA)، سرم فیزیولوژی و کلرید کلسیم (CaCl₂) ۲٪ و سوسپانسیون انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با لوگ ۷ CFU mL⁻¹ بودند. ابتدا سوسپانسیونی از باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه شده و جذب نوری آن با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری با طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. ۱۰ سی سی از محلول باکتریایی با لوگ CFU ۷ g⁻¹ در سرم فیزیولوژی تهیه و پس از آن با ۱۰۰ سی سی آب مقطر استریل حاوی آلژینات سدیم ۲٪ (استریل) به خوبی مخلوط گردید. سپس مخلوط تهیه شده با استفاده از سرنگ پلاستیکی با سرنگ G ۱۶، ۵۰ mm به آرامی و قطره به قطره با ارتفاع ۷ سانتی متر به ۱۶۰ سی سی محلول ۲٪ کلرید سدیم (۰/۱ M) داخل بشر شیشه‌ای استریل که بر روی یک هیتر همزن مغناطیسی (سرعت ۲۰۰ rpm) با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۵ دقیقه اضافه گردید. پس از اینکه تمام سوسپانسیون به صورت میکروکپسول درآمد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بدون حرکت نگه داری شد تا رسوب در کف بشر شیشه‌ای ته نشین شود. سپس رسوب توسط محلول سالین (saline solution) شسته شد (Rosas-Ledesma et al., 2011). برای جداسازی ژل میکروانکپسوله شده باکتری در آلژینات، محلول تهیه شده در دور ۱۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای جدا کردن کلرید کلسیم اضافه و پیوند نشده، فرآیند شستشو با آب پیتونه ۱٪ استریل انجام شد (همایونی راد و همکاران، ۱۳۹۳، پیمانفر و همکاران، ۱۳۸۷).

شرایط جدید، در عملیات سایزبندی (sort) تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی پس از زیست سنجی (اندازه گیری طول و وزن) و تعیین زیست توده با میانگین وزنی حدود ۴۵ گرم، به طور کاملاً تصادفی انتخاب شدند و با تراکم ۳۰ قطعه به هر حوضچه بتونی معرفی شدند.

زیست یار مورد استفاده

انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 (با شماره ثبت ژن 16s rRNA در ژن بانک: JX154575) استفاده شده در این تحقیق از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران تهیه شد. قابل الذکر است، سویه IR5 از میکروفولور باکتریایی روده تعدادی از قزل‌آلای رنگین کمان سالم پرورشی در استان مازندران جداسازی شده بود (صفری، ۱۳۹۲) و در گلیسرول ۲۰ درصد در فریزر ۲۰ °C - نگه داری می‌شد. بعد از قرار دادن باکتری فریز شده در دمای آزمایشگاه برای ۲ ساعت مقداری از باکتری را برداشته، در داخل محیط برات (MRS) (De Man, Rogosa, and Sharpe) (Difco; Detroit, Michigan, USA) تلقیح و در دمای ۳۷ °C برای ۲۴ ساعت به صورت هوازی در یک انکوباتور شیکردار (shaker incubator) با دور ۱۵۰ rpm، گرم‌خانه گذاری شد (Todar, 2008). سپس سلول های *E. faecium* که در محیط کشت MRS برات رشد یافته بودند داخل لوله در یک دستگاه سانتریفیوژ (Kokusuan, H-103N, Russia) (Centrifugus) با دور ۵۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتیگراد قرار داده شدند. ماده رویی دور ریخته شد و سلول های *E. faecium* رسوب کرده در ته لوله با سه بار شستن توسط آب مقطر استریل برداشت و تا زمان استفاده در دمای ۴ °C نگه داری شدند (Daum et al., 1982). غلظت نهایی با رقت cells ۱۰^{۱۰} mg⁻¹ تهیه گردید.

اندازه گیری قطر اندازه ذرات

اندازه میکروکپسول‌های حاصله از انتروکوکوس با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری ذرات (Particle Analyzer) مدل Zetasizer Nano - ZS ساخت شرکت مالورن (Malvern)، کشور انگلستان در آزمایشگاه گروه فارماسیوتیکس (pharmaceutics)، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، ساری، ایران تعیین شد (شکل ۲-۴). برای این منظور کپسول‌ها در آب یون‌زدایی شده (Mili Q Milipore USA) با ضریب هدایت $0.054 \mu\text{S}$ پراکنده و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین ذرات \pm انحراف معیار در حداکثرها (peaks) در درصد شدت‌های (Intensity %) مختلف بیان شد (رضایی مکرّم و همکاران، ۱۳۸۷).

طراحی آزمایش

در این بررسی از ۱۲ حوضچه بتونی مکعبی شکی به ابعاد $1 \times 0.6 \times 0.6$ متر و به عمق ۶۰ سانتیمتر استفاده شد. ابتدا حوضچه‌های بتونی شستشو و با آهک زنده $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ ضد عفونی شد. سپس جریان آب مورد استفاده به طور یک طرفه و بصورت افشان از بالای حوضچه وارد شده و از خروجی کف و وسط هر حوضچه خارج می‌شد. حجم آب ورودی تمامی حوضچه‌ها با یکدیگر مساوی بود و بطور مداوم در جریان بوده است. مقدار آب ورودی در هر حوضچه برابر ۱ الی $1/5$ لیتر در ثانیه بود. منبع تامین آب حوضچه‌ها، آب چاه موجود در کارگاه پرورش بود. فاکتورهای فیزیک و شیمیایی آب چاه خصوصی استفاده شده جهت تامین آب حوضچه‌های ماهیان مورد آزمایش توسط دستگاه ملتی پارامتر اندازه گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب چاه مورد استفاده در این مطالعه (انحراف معیار \pm میانگین).

محل	دما ($^{\circ}\text{C}$)	pH	اکسیژن محلول (mg L^{-1})	هدایت الکتریکی ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	کل مواد جامد محلول (mg L^{-1})
چاه خصوصی	18.8 ± 0.1	7.4 ± 0.0	7.2 ± 0.1	82.0 ± 0.0	458 ± 0.0

مزرعه

اکسیژن محلول: dissolved oxygen؛ هدایت الکتریکی: electrical conductivity؛ کل مواد جامد محلول: total dissolved solids

ماهیان مورد بررسی به ۲ تیمار (هر کدام سه تکرار) و یک گروه شاهد (سه تکرار) تقسیم شدند (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین وزنی و قد ماهیان قزل آلا رنگین کمان در گروه‌های مختلف در این تحقیق (انحراف معیار \pm میانگین).

تیمارها		شاهد	
۱	۲	۱	۲
میانگین وزنی (گرم)	44.8 ± 57.3^a	46.43 ± 67.2^a	67.44 ± 83.3^a
میانگین قدی (سانتی متر)	92.15 ± 0.11^a	75.15 ± 8.0^a	65.15 ± 7.0^a

تیمارها: ۱- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^8 CFU g^{-1} در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^9 CFU g^{-1} در خوراک. ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

گرم وزن نهایی = W_2 ; گرم وزن اولیه ماهی = W_1

(ب) درصد افزایش وزن (PBWI)

$$PBWI = [(W_1 (g) - W_2 (g) / W_1 (g)) \times 100$$

گرم وزن نهایی = W_2 ; گرم وزن اولیه ماهی = W_1

(ج) نرخ رشد ویژه (SGR)

$$SGR = [LnW_2 - LnW_1 / Days] \times 100$$

LnW_2 : لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی = LnW_1

= لگاریتم طبیعی وزن

طول دوره: Days

(د) شاخص وضعیت (CF)

$$CF = [W_1 (g) - W_2 (g) / L^3 (cm)] \times 100$$

گرم وزن نهایی = W_2 ; گرم وزن اولیه ماهی = W_1

L = طول کل ماهی

(ه) درصد زندهمانی (Survival)

$$Survival (\%) = (N_1 - N_2) \times 100$$

N_1 = تعداد اولیه ماهی; N_2 = تعداد ماهیان تلف شده

(و) نرخ بازده پروتئین (PER)

$$PER = Live WG (g) / Protein intake (g)$$

وزن به دست آمده در هر ماهی = Live WG

پروتئین غذای مصرف شده = Protein intake

توسط هر ماهی

(ز) ضریب تبدیل غذایی (FCR)

$$FCR (\%) = [Live WG (g) / Dry feed eaten (g)] \times 100$$

Live WG = وزن به دست آمده در هر ماهی Dry

feed eaten = غذای خشک خورده شده

زیست سنجی (biometry)

زیست سنجی ماهیان به منظور تعیین میزان زیست توده (biomass) و غذای مورد نیاز (در طول ۸ هفته پرورش) هر دو هفته یکبار (روزهای ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ آزمایش) پس از ۲۴ ساعت قطع (deprive) غذا پس از نیمه بیهوشی با عصاره گل میخک (clove oil) (۲۰۰ ppm)، ۱۵ قطعه ماهی در هر تیمار (۵ قطعه در هر تکرار) و شاهد (۵ قطعه در هر تکرار، در کل ۱۵ قطعه) زیست سنجی گردیدند. بطوری که در هر بار مشخصات ۴۵ قطعه ماهی با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۱ گرم) توزین و با تخته اندازه گیری ۳۰ سانتیمتری (با دقت ۱ میلی متر) طول آن‌ها اندازه گیری گردید. اطلاعات حاصله از زیست سنجی در فرم‌های مخصوص که برای این منظور طراحی شده بودند، ثبت شد. ماهیان نیمه بیهوش زیست سنجی شده، پس از اکسیژن دهی فراوان زمانی که هوشیاری خود را بدست آوردند دوباره به حوضچه‌ها مربوطه وارد شدند (Rodas, et al., 2002).

در میانه و انتهای بررسی تلفات دوره محاسبه گردید. همچنین شاخص های رشد، مرفومتیک، تغذیه‌ای و سلامتی؛ شامل وزن اکتسابی (Weight Gain)، درصد افزایش وزن (Percent Body Weight Increase)، نرخ رشد ویژه (Weight Increase Condition)، شاخص وضعیت (Growth Rate Factor)، نرخ بازده پروتئین (Protein efficiency ratio)، ضریب تبدیل غذایی (Feed Conversion Ratio) و درصد زندهمانی (Survival) ماهیان در تیمارهای مختلف آزمایش و شاهد بررسی گردید. به منظور ارزیابی روند رشد، علاوه بر اندازه گیری وزن و طول کل ماهیان، شاخص‌های رشد بر اساس منابع موجود از معادلات ریاضی محاسبه شدند (Samantaray and Mohanty, 1997).

(الف) وزن اکتسابی (WG)

$$WG = W_1 (g) - W_2 (g)$$

نحوه غذا دهی

مقدار غذای روزانه بر اساس جدول استاندارد در نظر گرفته شد (فرزانفر، ۱۳۷۲)، با توجه به اندازه و میانگین وزنی بچه ماهیان و درجه حرارت آب غذا دهی به میزان ۲/۲ درصد وزن توده زنده (از ابتدای دوره پرورش تا انتها)، بصورت دستی و در سه نوبت (در ساعات ۷، ۱۲ و ۱۷) انجام شد. غذای ماهیان بر اساس شماره هر تیمار در ظروف جداگانه و مخصوص نگهداری می شد و هنگام غذادهی با استفاده از

ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شده و در سطح آب حوضچه‌ها توزیع گردید. هر حوضچه هر دو هفته هنگام تعیین زیست سنجی (اندازه‌گیری وزن و قد)، حوضچه مورد نظر توسط یک برس مخصوص تمیز کردن سطوح سخت تمیز می شد تا غذای احتمالی مصرف نشده و فضولات از محیط پرورش توسط جریان آب و خروجی کف حوضچه خارج گردد. آنالیز تقریبی خوراک تجاری پایه مصرف شده (EXG1) در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- آنالیز تقریبی خوراک تجاری پایه مصرف شده در این تحقیق.

خوراک	سایز (سانتیمتر)	پروتئین خام (گرم)	چربی خام (گرم)	فیبر (%)	رطوبت حداکثر (%)
EXG1	۴±۰/۳	۳۸	۱۶	۳	۱۰

EXG1: خوراک تجاری EXG1، ساخت شرکت کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران

منظور شمار کل باکتری‌های قابل رشد (total Merrifield et al,) (TVC: viable count) و ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی MRS (2010) و آگار برای شمارش تعداد باکتری‌های قابل رشد گروه اسیدلایک (MHPRC, 2010) اسپری شد. کلنی-های باکتریایی بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۶ °C به مدت ۴۸ ساعت شمرده شدند (Nikoskelainen et al, 2003; Capkin and) (Altinok, 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحقیق از طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely Randomized (CRD) Design در سه تکرار برای هر تیمار و شاهد استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها پس از تست Shapiro wilk جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و میانگین بدست آمده از هر آزمایش، از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA و جهت اختلاف معنی دار آماری از روش دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ (P<0.05) تعیین گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم

شمارش کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک در روده در دو نوبت پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم دو ماهی از هر حوضچه (۶ ماهی از هر تیمار) از نمونه‌هایی که خونگیری شده بودند به طور تصادفی انتخاب و پس از عملیات بیهوش کردن با گل میخک با یک ضربه به کاسه سر کشته شدند. در یک بشر حاوی الکل اتیلیک (C₂H₅OH) ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند تا سطح بدن ماهیان از آلودگی عاری گردد. سپس ماهیان بر روی یک سینی تشریح استریل در زیر هود آزمایشگاه توسط یک قیچی، پنس و تیغ جراحی استریل کالبدگاشی شدند. کل روده هر ماهی از محوطه شکمی خارج و از یک سانتیمتری به انتها توسط یک قیچی استریل بریده شد. یک گرم از هر روده در ۰/۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل جداگانه هموژن گردید (Brunt and Austin, 2005). رقت نمونه توسط سرم فیزیولوژی استریل به ۱-۱۰۶ CFU mL رسانده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA (tryptic soya agar) (Merck, Germany) داخل پلیت یکبار مصرف استریل به-

افزارهای (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) و SPSS 18 و رسم نمودارها به کمک Excel 2010 صورت گرفت. نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین بیان شد.

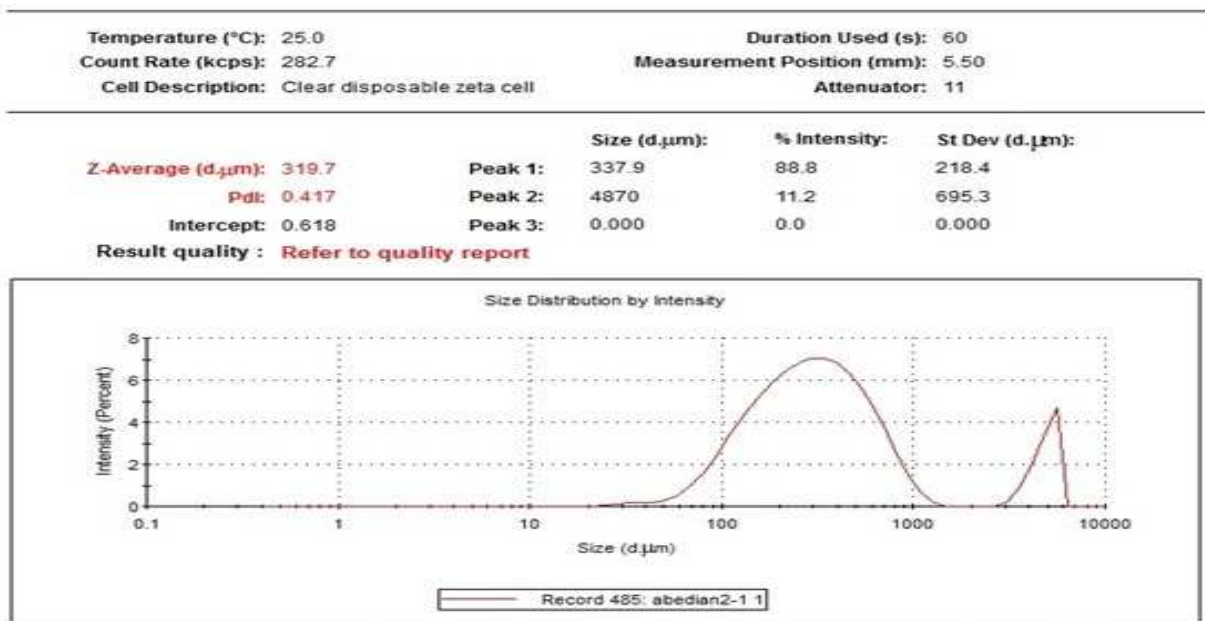
نتایج فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش در میزان فاکتورهای دما، اکسیژن و pH آب حوضچه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۴- مقایسه میزان دما، اکسیژن و pH آب حوضچه‌های پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق (انحراف معیار± میانگین).

شاهد	تیمارها		پارامتر
	۲	۱	
۱۸/۹۲±۰/۴۵ ^a	۱۹/۰۲±۰/۰۸ ^a	۱۸/۹۸±۰/۰۷ ^a	دمای آب (°C)
۸/۱۸±۰/۲۴ ^a	۸/۱۹±۰/۳۴ ^a	۸/۱۷±۰/۲ ^a	میزان اکسیژن (mg L ⁻¹)
۷/۶۴±۰/۰۴ ^a	۷/۶۷±۰/۰۲ ^a	۷/۶۷±۰/۰۱ ^a	pH

تیمارها: ۱- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^8 CFU g⁻¹ × ۲/۵ در خوراک، ۲- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^9 CFU g⁻¹ × ۱ در خوراک. ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) است.

اندازه قطر میکروذرات پروبیوتیک (تیمار ۱ و ۲) معادل ۳۳۷/۹±۲۱۸/۴ میکرومتر و قطر ۱۱/۲٪ از ذرات معادل ذرات، قطر ۸۸/۸٪ از ذرات میکروانکپسوله ۴۸۷۰±۶۹۵/۳ میکرومتر بوند (نمودار ۱).



نمودار ۱- پراکنش سایز ذرات میکروانکپسوله شده پروبیوتیک *E. faecium* سویه IR5 بوسیله روش اکستروژن.

شاخص های رشد، مرفومتربیک و سلامتی
 نتایج آنالیز واریانس یک طرف و آزمون دانکن برای
 میانگین وزن بدست آمده، طول کل، نرخ رشد ویژه،
 درصد افزایش وزن، شاخص وضعیت و درصد زنده-
 مانی در تیمارهای مورد بررسی و شاهد در جدول ۵
 ارائه شده است.

جدول ۵- مقایسه میانگین شاخص های رشد، مرفومتربیک و سلامت در ماهیان قزل آلابی رنگین کمان (در میان دوره و پایان دوره)
 (انحراف معیار ± میانگین).

شاخص	تیمارها		دفعات بررسی	شاهد
	۱	۲		
WG (g)	^a ۲۱/۲۷±۵/۹۴	^a ۲۶/۲±۴/۰۴		^a ۱۹/۷۳±۰/۹۵
TL (cm)	^a ۱۹/۳۴±۱/۱۷	^a ۱۹/۵۴±۱/۱۲		^a ۱۸/۶۲±۱/۰۷
SGR (%)	^b ۱/۲۱±۰/۳۲	^a ۱/۴۶±۰/۲۹		^b ۱/۱۴±۰/۱۱
BWI (%)	^b ۴۰/۹±۱۶/۷۹	^a ۵۰/۳۸±۱۳/۵۷	میان	^b ۳۷/۹۴±۴/۴۸
CF (%)	^a ۱/۱۱±۰/۰۶	^b ۰/۹۴±۰/۰۹	دوره	^a ۱/۰۵±۰/۰۹
Surv. (%)	^a ۱۰۰±۰/۰	^a ۱۰۰±۰/۰		^a ۱۰۰±۰/۰
WG (g)	^a ۷۱/۰۸±۲/۳۲	^b ۵۹/۰۷±۱/۵۱		^c ۵۲/۸۳±۷/۷۳
TL (cm)	^a ۲۲/۲۴±۱/۴	^b ۲۰/۹۸±۱/۰۶		^b ۱۹/۸۴±۲/۲۵
SGR (%)	^a ۱/۵۳±۰/۱۳	^b ۱/۳۶±۰/۰۶		^c ۱/۰۹±۰/۱۷
BWI (%)	^a ۱۳۶/۷۵±۱۹/۰۶	^b ۱۱۳/۹۷±۶/۶۲	پایان	^c ۱۰۱/۵۶±۲۳/۲۹
CF (%)	^a ۱/۰۷±۰/۰۷	^b ۱/۰۰±۰/۰۸	دوره	^a ۱/۱۲±۰/۰۱
Surv. (%)	^a ۱۰۰±۰/۰	^a ۱۰۰±۰/۰		^a ۱۰۰±۰/۰

تیمارها: ۱- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله /نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^8 CFU g^{-1} در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله /نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^9 CFU g^{-1} در خوراک.
 WG: وزن بدست آمده، TL: طول کل، SGR: نرخ رشد ویژه، BWI: درصد افزایش وزن، CF: شاخص وضعیت، Sury: درصد زنده مانی.
 ارزشها در هر ردیف با علامت های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) است.

فاکتورهای تغذیه نتایج آنالیز واریانس یک طرف و آزمون دانکن برای میانگین نرخ پروتئینی و ضریب تبدیل غذایی در جدول ۶- مقایسه میزان میانگین شاخص‌های تغذیه‌ای در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (در میان دوره و پایان دوره) (انحراف معیار± میانگین).

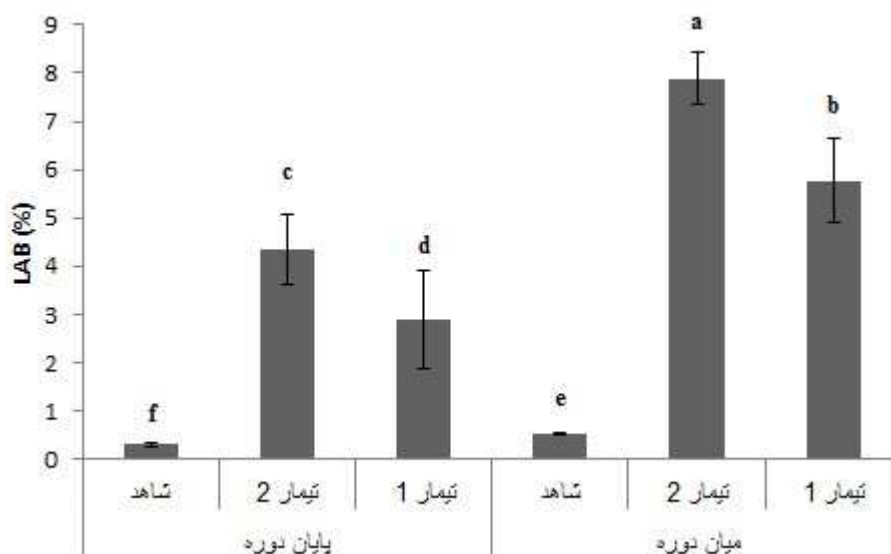
شاخص	تیمارها		دفعات بررسی	شاهد
	۱	۲		
PER (g)	۲/۴۱±۰/۴۲	۲/۵۷±۰/۶۱	میان دوره	۲/۳۶±۰/۱
FCR (%)	b۱/۰۹±۰/۴۱	b۱/۰۲±۰/۱۴		a۱/۱۶±۰/۰۶
PER (g)	a۲/۲۳±۰/۱۹	d۲/۰۲±۰/۰۵	پایان دوره	c۱/۹±۰/۲۸
FCR (%)	b۱/۱۸±۰/۰۹	a۱/۳۱±۰/۰۶		a۱/۳۸±۰/۰۲

تیمارها: ۱- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^8 CFU g⁻¹ در خوراک، ۲- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^9 CFU g⁻¹ در خوراک. PER: نرخ بازده پروتئینی، FCR: ضریب تبدیل غذایی. ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (P<0.05) است.

بررسی‌های باکتریایی روده یک گرم روده ماهیان مورد بررسی در این آزمایش در جدول ۷ ارائه گردیده‌است. نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن میانگین لوگ کل باکتری‌های قابل کشت و اسیدلاکتیک در جدول ۷- مقایسه میانگین لوگ کل باکتری‌های قابل کشت و کل باکتری‌های اسید لاکتیک در یک گرم روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف و شاهد (میان دوره و پایان دوره بررسی) (انحراف معیار± میانگین).

شاخص	تیمارها		دفعات بررسی	شاهد
	۱	۲		
TBC (Log CFU g ⁻¹)	۷/۸۱±۰/۵۱	۷/۷۳±۰/۳۷	میان دوره	۷/۴۵±۰/۰۷
LAB (Log CFU g ⁻¹)	۶/۳۷±۰/۶۵	a۶/۴۳±۰/۴۱		b۴/۲۸±۰/۳۶
TBC (Log CFU g ⁻¹)	۷/۷۸±۰/۰۸	۷/۷۶±۰/۱	پایان دوره	۶/۹۹±۱/۳۲
LAB (Log CFU g ⁻¹)	a۶/۵۴±۰/۱۴	a۶/۷۱±۰/۰۳		b۴/۳۱±۰/۹۷

تیمارها: ۱- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^8 CFU g⁻¹ در خوراک، ۲- حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله/نتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با دوز 10^9 CFU g⁻¹ در خوراک. TBC: کل باکتری‌های قابل کشت، LAB: کل باکتری‌های اسیدلاکتیک. ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (P<0.05) است.



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد لوگ کل باکتریهای اسیدلاکتیک قابل کشت به کل باکتریهای قابل رشد در یک گرم روده در تیمارهای مختلف طی دو مرحله نمونه برداری (انحراف معیار \pm میانگین).

گروه پروبیوتیک: ۱، جیره حاوی لوگ 10^4 CFU g⁻¹ *E. faecium* میکروانکپسوله؛ ۲، جیره حاوی لوگ 10^9 CFU g⁻¹ *E. faecium* میکروانکپسوله.

حروف غیر همنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد ($P < 0.05$).

لاکتیکی و پروبیوتیک ها به کار رفته است. از مزایای ریزپوشانی با آلژینات می توان به فناوری آسان و سهولت کار، سمی نبودن آن، ارزان بودن و این که به عنوان افزودنی مجاز غذایی شناخته شده است اشاره کرد (Sheu et al., 1393, Allan-Wojtas et al., 2004). به طور عمومی محدوده ای اندازه ای میکروذرات تهیه شده با روش های مختلف میکروانکپسوله در محدوده ای چندصد میکرومتر گزارش شده است. در واقع سایز قطر میکرو ذرات باید کوچک (کمتر از ۱ میلی متر) باشد و توصیه شده این موضوع در روش کار باید تحت مراقبت قرار گیرد. عموماً سایز قطر میکروذرات تولید شده با استفاده از تکنیک اکستروژن بسیار متفاوت است و به طور کلی ذرات زیر ۳۰۰ میکرومتر توصیه نمی شود (Rokka and Rantamäki 2010; Burgain et al., 2011). قابل ذکر است، اندازه ی قطر ذرات به عواملی مانند اندازه ی قطر نازل قطره چکان و فاصله ی نازل تا سطح محلول حاوی

بحث

در این تحقیق از پروبیوتیک *Enterococcus faecium* با دوزهای مختلف حاوی لوگ ۳ لوگ 10^4 و ۹ ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم ۲٪ به همراه گروه کنترل (هر تیمار سه تکرار) برای یک دوره زمانی ۸ هفته ای در جیره غذایی ماهی قزل آلا ی رنگین کمان استفاده شد. قابل الذکر است، پروبیوتیک استفاده شده در این تحقیق متعلق به گروه باکتری-های اسید لاکتیک بود (Kongo, 2013). فرایند ریز-پوشانی کردن پروبیوتیک ها می تواند باعث افزایش بقای آنان در زمان نگهداری و در طی فرایند عبور از اسید معده و نمک های صفراوی در روده کوچک گردد (Cebeci and Gurakan, 2003; Charteries et al., 1998). این نکته قابل توجه است که زنده مانده پروبیوتیک ها یک امر مهم در میزان تاثیر آنها بر روی میزان رشد و مقاومت در برابر میکروب های بیماریزاست (Lahtinen et al., 2012). آلژینات کلسیم به میزان گسترده در ریزپوشانی باکتری های

Merrifield) *B. licheniformis* و (et al., 2010b
 (et al., 2010b) بهتر می تواند با اکولوژی محیط روده
 ماهی تیلاپیا سازگار شود. با توجه به اینکه مطالعات
 گذشته نشان دادند که *E. faecium* نسبت به دمای
 محیط پرورش ماهیان سردآبی (Panigrahi et al.,
 2007)، pH و نمک‌های صفاوی نسبتاً مقاوم است
 (Nikoskelainen et al., 2001) و همچنین فرآیند
 پوشش‌دار کردن می‌تواند این باکتری مقاومتش نسبت
 به pH و نمک‌های صفاوی دستگاه گوارش افزایش
 یافته‌است (Hernández-Carranza et al., 2013).
 از طرفی کاهش معنی‌داری در درصد باکتری‌های
 اسیدلاکتیک در روده در تیمار ۱ و گروه کنترل نسبت
 به تیمار ۲ (*E. faecium*) با لوگ (CFU g-1) ۹ در
 غذا) مشاهده شد ($P < 0.05$) که می‌تواند به علت بالاتر
 بودن دوز مصرفی پروبیوتیک *E. faecium* در جیره
 ماهیان در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۱ باشد
 (Merrifield et al., 2010a,b). علت اینکه باکتری-
 های پروبیوتیک قادرند تا بر روی سلول‌های اپیتلیال
 کلنیزه شوند و جلوی چسبیدن پاتوژن‌ها را به
 اپیتلیال بگیرند وجود مکانسیمی است در ارتباط
 پروبیوتیک‌ها و میزبان. تأثیرات ضد چسبیدن پاتوژن-
 ها به گیرنده‌های مشابه ممکن است به علت تولید
 موسین (mucin) افزایش یابد (Oelschlaeger,
 2010). گزارشاتی در مورد این خاصیت ضد
 چسبندگی موسین در مورد تعداد دیگری از
 پروبیوتیکی‌های گروه لاکتوباسیل توسط سایر محققین
 در محیط آزمایشگاه گزارش شده‌است (Li et al.,
 2015). هرچند که در مورد *Enterococcus* به‌ویژه
 در مورد *E. faecalis* گزارشاتی وجود دارد که
 باکتری فوق‌الذکر، بوسیله‌ی تولید glycosidases
 می‌تواند باعث کاهش موسین در لایه‌ی موکوسی
 مخاطی روده شود (Lammers, 2008). اما به‌نظر
 می‌رسد این امر در مورد *E. faecium* متفاوت باشد.
 Araújo و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که هیچ
 یک از *E. faecium* جدا شده از ماهی قزل‌آلا رنگین-
 کمان، غذا و محیط پرورش آن ویژگی توانایی مصرف

پروبیوتیک بستگی دارد (Ghorbani and
 Zomorodi, 2015). قطر ذرات با توجه به داده‌های
 به دست‌آمده از منحنی توزیع ذرات در مطالعه‌ی
 حاضر، قطر $0.88/8$ ذرات معادل $21/8 \pm 337/9$
 میکرومتر و قطر $0.11/2$ ذرات معادل $69/5 \pm 487/0$
 میکرومتر بودند (نمودار ۱). این نتایج در محدوده‌ی
 توصیه شده توسط محققین پیشین است (Rokka
 and Rantamäki 2010; Burgain et al., 2011).
 با توجه به افزایش معنی‌دار فاکتورهای رشد
 ($P < 0.05$) در تیمارهای حاوی پروبیوتیک
 انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 نسبت به گروه شاهد
 نشان می‌دهد که فرایند ریزپوشانی تأثیر منفی بر
 طعم غذا نداشته‌است. این نتایج صحیح بودن فرآیند
 ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در این تحقیق را تأیید می-
 کند.

دوز انتخابی پروبیوتیک مصرفی می‌تواند تأثیرات
 متفاوتی را در واکنش میزبان نسبت به جیره غنی‌شده
 با پروبیوتیک باعث شود (Nikoskelainen et al.,
 2001, 2003; Panigrahi et al., 2004; Bagheri
 et al., 2008). Lahtinen و همکاران (۲۰۱۲) بیان
 داشتند که دوز مصرف پروبیوتیک بین لوگ ۸ و ۹ در
 جیره برای بهبود رشد و افزایش ایمنی مناسب است.
 مطالعات گذشته نشان داد که مصرف پروبیوتیک‌ها
 می‌تواند باعث افزایش جمعیت باکتری‌های
 اسیدلاکتیک در روده گردد (Merrifield et al.,
 2010a,b; Campbell-MaBride, 2004). این امر
 با نتایج حاصل از این مطالعه سازگار است. سلول‌های
 انتروکوکوس فسیوم دارای پیل (pili) بر روی دیواره-
 ی خود هستند (Murray et al., 1990; Van
 Wamel et al., 2007). پیل‌ها می‌توانند به حرکت و
 چسبیدن باکتری‌های گرم مثبت به دیواره روده کمک
 کند و باعث تحریک ایمنی در میزبان گردند (Van
 Gerven et al., 2011). گروهی از محققین در
 مطالعات جداگانه‌ای نشان دادند که پروبیوتیک
 انتروکوکوس فسیوم نسبت به پروبیوتیک‌های *B.*
 subtilis (Panigrahi et al. 2007; Merrifield)

دارد. با توجه به افزایش وزن نهایی در گروه‌های پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل انتظار می‌رود تا ضریب چاقی در این گروه‌ها بیشتر از کنترل باشد. اما نتایج اندازه طول ماهیان افزایش معنی‌داری در گروه‌های پروبیوتیک مشاهده شد. با توجه به فرمول محاسبه ضریب چاقی می‌توان نتیجه گرفت که طول ماهیان تاثیر بیشتری (طول کل) [۳] بر میزان این فاکتور دارد. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج Safari و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد. در نتیجه به نظر می‌رسد افزایش وزن نهایی در گروه پروبیوتیک‌ها بیشتر مربوط به افزایش طول کل ماهیان باشد تا افزایش چاقی در آنان. در مورد تیمار ۲ (جیره حاوی شکل میکروکپسوله *E. faecium* لوگ 9 CFU g^{-1} در جیره) در این تحقیق شاخص-های رشد (درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، افزایش وزن بدست آمده و نرخ بازده پروتئینی) که در ۴ هفتگی نسبت به تیمار ۱ و گروه کنترل افزایش نشان دادند، اما در ۸ هفتگی نسبت تیمار ۱ کاهش نشان دادند. این امر همراه با افزایش معنی‌دار میانگین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده در تیمار ۲ بعد از ۸ هفتگی بود ($P < 0.05$) اما در ۴ هفتگی این تعداد کمتر از ۸ هفتگی محاسبه شد. Ramos و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند یک دوز بالاتر ($1.06 \times 10^6 \text{ CFU g}^{-1} \times 1/6$) از یک دوز پائین-تر ($1.05 \times 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \times 1/6$) از چند گونه (*Bacillus* sp., *Pedococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) باعث اختلال در جمعیت میکروبی و تحریک سیستم ایمنی دستگاه گوارش همراه با اتلاف انرژی و مواد مغذی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود. در مطالعه دیگری که توسط Li و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، مشاهده شد که دوز بالاتر *L. rhamnosus* ACTT 7469 ($10^{12} \text{ CFU day}^{-1}$) در نسبت به دوز $10^{10} \text{ CFU day}^{-1}$ (در جیره) باعث کاهش ایمنی و افزایش اسهال در گوسفند گردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد دوز 10^9 CFU g^{-1} پروبیوتیک میکروانکپسوله *E.*

نمک و کاهش موسین را نداشتند. این با یافته‌های ما در مورد توانایی بیشتر و معنی‌دار چسبندگی *E. faecium* strain IR5 در تیمارهای حاوی پروبیوتیک را نسبت به گروه کنترل در این آزمایش مطابقت دارد ($P < 0.05$ ؛ جدول ۷ و نمودار ۲).

تاثیرات عمومی پروبیوتیک‌های اسیدلاکتیک بر روی افزایش مقاومت به استرس در ماهی و سایر حیوانات آبی در صنعت آبی‌پروری با هضم مواد غذایی و تولید ویتامین‌ها، کمک به تحریک و افزایش سیستم ایمنی، شکستن سلولز و سایر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها به در بسیاری از گزارشات قید شده‌است (Verschuere, 2000; Gatesoupe, 1999; Sun et al., 2011; Mahmoudzadeh et al., 2016) در واقع خواص پروبیوتیک *E. faecium* در توانایی کاهش pH به ۵/۵، تولید پراکسید هیدروژن، توانایی شکستن پروتئین‌ها و تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط روده است. این امر باعث شده تا *E. faecium* بسیار سریع در لیست بازار فروش پروبیوتیک‌ها وارد شود (Tomás et al., Juven and Pierson, 1996) افزایش معنی‌دار در درصد بازماندگی گروه‌های ۱، ۲ (حاوی پروبیوتیک) نسبت به گروه شاهد بیان‌گر وضعیت سلامت بهتر ماهیان در دسته‌های پروبیوتیک است ($P < 0.05$).

Merrifield و همکاران (۲۰۱۰b) در گزارشی افزایش معنی‌دار میزان نرخ رشد روزانه (SGR) و کاهش معنی‌دار FCR را در قزل‌آلای رنگین‌کمان که جیره حاوی پروبیوتیک *E. faecium* (حاوی لوگ 10^8 CFU g^{-1} در جیره) برای ۱۰ هفته (روزی دوبار) مصرف می‌کردند را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P < 0.05$). این نتایج با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. نتایج این تحقیقی نشان دادند که تنها فاکتور افزایش یافته در گروه کنترل نسبت به گروه‌های پروبیوتیک میزان ضریب چاقی در پایان ۸ هفتگی بود. ضریب چاقی رابطه مستقیمی با وزن (گرم) و رابطه معکوسی با اندازه طول (سانتی‌متر)

استفاده به‌عنوان پروبیوتیک‌ها مناسب هستند. بنابراین *E. faecium* سویه IR5 می‌تواند برای مصرف مانند یک پروبیوتیک برای قزل‌آلای رنگین کمان امن و مناسب باشد. همچنان که آن از ماهیان سالم جدا شد و گروه‌های آزمایشی با این میکروانکپسول‌ها هیچ‌گونه نشان کلینیکی از عفونت یا غیرطبیعی بودن را از خود بروز ندادند.

این تحقیق پیشنهاد می‌کند، *E. faecium* سویه IR5 ریز پوشانی شده با آلژینات سدیم (۰.۲٪) در جیره با لوگ 9 CFU g^{-1} تنها برای یک دوره زمانی حداکثر ۴ هفته‌ای برای قزل‌آلای‌های جوان بکار رود و با لوگ 8 CFU g^{-1} می‌تواند برای یک دوره طولانی‌تر (۸ هفته) در جیره به‌منظور افزایش سلامت، بهبود تغذیه و افزایش رشد بکار گرفته شود.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر برای دراختیار قرار دادند / انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 و از رضا صفری برای کمک‌های تکنیکی در این تحقیق صمیمانه تشکر می‌کنند.

faecium سویه IR5 برای ۴ هفته می‌تواند تأثیرات مفیدتری در فاکتورهای رشد نسبت به تیمار ۱ (جیره حاوی لوگ $8/4 \text{ CFU g}^{-1}$ *E. faecium* میکروانکپسوله) و همچنین گروه شاهد داشته باشد و با افزایش روزهای مصرف در ۸ هفتگی این امتیاز خود را نسبت به تیمار ۱ از دست می‌دهد.

در تیمار ۲ (*E. faecium* سویه IR5 با لوگ 9 g^{-1} در خوراک) هرچند که در هفته‌ی ۴ با بالاترین میزان در شاخص‌های رشد، کارایی غذایی، سلامت و افزایش درصد باکتری‌های اسیدلایک در روده در بین تمامی تیمارهای مورد آزمایش در رتبه نخست قرار گرفت، اما با افزایش روزهای پرورش در ۸ هفتگی در تمامی شاخص‌های فوق‌الذکر به رتبه دوم قبل از گروه کنترل نزول کرد. این نتایج با میزان حضور باکتری‌های اسیدلایک در ۴ و ۸ هفتگی در روده قزل‌آلای‌هایی که جیره حاوی میکروانکپسوله *E. faecium* در جیره با لوگ 9 CFU g^{-1} قابل توجیه می‌باشد (Ramos et al., 2015).

Araújo و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که ۱۷ (۲۶/۶٪) از ۶۴ انتروکوک (enterococcal) جداسازی شده از قزل‌آلایها نبودند مقاوم به هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌ها و فاکتور حدت نداشتند، پس برای

منابع

- fixation. *LWT-Food Sci. Technol.* 41, 101-108.
- Araujo G.V, Oliveira Junior M,H, Peixoto D.M., Sarinho E.S. (2015). Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. *J Pediatr (Rio J)*,91, 413-27.
- Baba Alian A., Azari Takami G., Abedian Amiri A., Khodadadi A., Keshavarz M., Arabzadeh P., Amiri S. (2014). Investigation the Role of Physical and Chemical Parameters on Yersiniosis Outbreak in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum) Farms in Iran. *WJFMS*, 6 (6), 499-503.
- Bagheri T., Hedayati S., Yavari V., Alizade M., Farzanfar A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 8: 43-48.
- Brunt J., Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28, 693-701.
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.
- Campbell-McBride, N. (2004). *Gut and Psychology Syndrome*. Cambridge, UK, 264.
- Capkin E., Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J Appl Microbiol.*, 106, 1147-1153.
- Cebeci A, Gurakan A. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus* pyimanager ش., کسری کرمانشاهی ر. و فولادی ج. (۱۳۸۷). بررسی خصوصیات دو سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از علوفه سیلوشده ذرت و سبوس برنج و پوشش دادن آنها با پلیمرهای آلژینات و کیتوزان برای افزایش پایداری آنها. مجله علمی-پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)، ۳۵، ۲۲۳-۲۳۲.
- رضایی مکرّم ر، مرتضوی س.ع، نجفی حبیبی م.ب، شهیدی ف، خمیری م. (1387)، اثر میکروانکپسولاسیون آلژینات کلسیم بر قابلیت، زنده ماندن لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس PTCC 1643 در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان، هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی مشهد، ایران. صفری ر. (۱۳۹۲). بررسی امکان تولید پروبیوتیک بمنظور افزایش سیستم ایمنی قزل آلا در برابر بیماری استریتوکوکوزیس و مقایسه آن با پروبیوتیکهای وارداتی. گزارش نهایی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ۱۲۲ صفحه.
- فدایی فرد ف. (۱۳۹۵). قزل آلا ی رنگین کمان؛ پرورش، مدیریت بهداشتی، بیماری‌ها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، ۱۶۸ صفحه.
- قشقایی ر. و لایق م. (۱۳۸۳). پروبیوتیک‌ها: تکنولوژی نوین در آبی پروری. نقش مهر، تهران، ۸۳ ص.
- همایونی راد ع، حاجی اقراری ف. و دهقانی س. (۱۳۹۳). بررسی روشهای انکپسولاسیون پروبیوتیکها جهت استفاده در محصولات لبنی. بیست و دومین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی. ۴ صفحه.
- Allan-Wojtas P., Hansen L.T., Paulson A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous

- and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.* 59, 1233-1241.
- Juven B.J., Pierson M.D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J Food Port*, 59, 1233-1241.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E., Salari-Joo H. (2013). A Review on Aquaculture Development in Iran, *ECOPERSIA*, 1, 2.
- Kongo J.M. (2013) Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments, chapter 1.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 14:737-743.
- Lahtinen S.J., Forssten S., Aakko J., Granlund L., Rautonen N. Salminen S., Viitanen M., Ouwehand, A.C. (2012). Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and lactobacillus acidophilus NCFM® modifies subpopulations of fecal *lactobacilli* and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age (Dordr)*, 34, 133-143.
- Lammers M. (2008). Physiology of *Enterococcus faecalis* and *faecium*. Master Immunity and Infection thesis, Department of Medical Microbiology, University of Utrecht, Netherlands, p, 26.
- Li H., Limenitakis J.P., Ganai S.C., Macpherson A.J. (2015). Penetrability of the inner mucus layer: who is out there?. *EMBO reports*, 16, 127-129.
- Li X.Q., Zhu, Y. H., Zhang, H.-F., Zhu Y.H., Yue Y., Cai Z.X. et al. (2012). Risks Associated with High-Dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* Model of Piglet Diarrhoea: Intestinal Microbiota and Immune Imbalances. *PLoS ONE*, 7, e40666.doi:10.1371/journal.pone.0040666.
- plantarum* strains. *Food Microbiol*, 20, 511-518.
- Clifford H., (2013). "Feeding the Future with Genetically Modified Foods", Final record, Biomarine business convention, Halifax world trade and convention center, Halifax, Nova Scotia, Canada, p: 15.
- Charteris W.A., Kelly P.M., Morelli, L., Collins J.L. (1998). Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 759-768.
- Daum G., Böhni P.C., Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *JBC*, 257, 13028-13033.
- FAO (2006). Probiotics in food: health and nutrition properties and guidelines for evaluation- FAO Food and Nutrition, p: 85.
- FAO (2016). [Online]. Available: <http://www.fao.org/fishery/facp/IRN/en#CountrySector-ProductionSector>.
- Gatesoupe F. J., (1999). The use of probiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture*. 180: 147-165.
- Ghorbani H., Zomorodi S. (2015). Designing and Manufacturing of Microencapsulated Device. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 4, 182-185.
- Hernandez-Carranza P., Lopez-Malo A., Jimenez-Mungu M.T.(2013). Microencapsulation quality and efficiency of *lactobacillus casei* by spray drying using maltodextrin and vegetable extracts. *Journal of Food Research*, 3, 61-69.
- Juven B.J., Pierson M.D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide

- Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15, 443-52.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius, E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15, 443-52.
- Oelschlaeger T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int J Med Microbiol*, 300: 57–62.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S., Sugita H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 379–388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi T, Sugita H., Puangkaew, J., and Aoki, T., (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developm Comparat Immunol.*, 31, 372 – 382.
- Ramos M.A., Gonçalves J.F., Batista S., Costas B., Pires M.A., Rema P., Ozório R.O. (2015). Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish Shellfish Immunology*, 45, 19-26.
- Rodas C, Gelvez N, Keyeux G.(2002). Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and Mestizo Populations. *Hum Biol.*,75, 13–30
- Mahmoudzadeh M., (2016). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *IJFS*, 15 (1), 347-359.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Bradley G., Baker R.T.M., Davies S.J. (2010b). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16, 504–510.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Børgwald J., Castex M., Ringø, E. (2010a). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302,1–18.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J. (2010b). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16, 504–510.
- Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. (1990). Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol.* 28, 2059–63.
- Nafisi Bahabad M., Azhar L. (2015). Overview of cold water fish aquaculture rapid growth in Iran. *Aquaculture Europe 15*, Available: <https://www.was.org/easonline/Mobile/Paper.aspx?i=1867>.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Salminen S., Bylund G (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198: 229–236.

- Todar K. (2008). Online textbook of bacteriology. Lactic Acid Bacteria, P.5. <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>.
- Tomas M.S., Claudia Oter M., Ocana V., Elena Nader-Macias M. (2004). Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. *Methods Mol. Biol.*, 268:337–346.
- Tomás M.S., Otero M.C., Ocaña V.S., Nader-Macías M.E. (2004). Production of antimicrobial substances in lactic acid bacteria. Determination of hydrogen peroxide. In: Spencer JFT, de Ragout Spencer AL (eds) *Methods in molecular biology. Public health microbiology: methods and protocols*, vol 268. Humana Press Inc., Totowa, pp 337–346
- Van Gerven N., Waksman G., Remaut, H. (2011). Pili and flagella: biology, structure, and biotechnological applications. *Prog Mol Biol transl Sci*, 103, 21-27.
- Van Wamel W.J., Hendrickx A.P., Bonten M.J., Top J., Posthuma G., Willems R.J. (2007). Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun.*, 75, 924-31.
- Verschuere, L., Rombaut G, Sorgeloos P. and Verstraete W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64, 655-71.
- Zuidam N.J., Nedović V. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer, New York, P. 269.
- Rokka S., Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol.*, 231, 1–12.
- Rosas-Ledesma P., LeÓN-Rubio J.M., AlarcÓN F.J., Balenona M.C. (2011). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: Assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43, 106 – 116.
- Rumpold B.A., Schlüter O. K. (2013) Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 1-11.
- Safari R., Adel M., Lazado C.C., Caipang,C.M.A., Dadar, M. (2016). Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish Shellfish Immunol.* 52, 198-205.
- Samantaray K., Mohanty S.S., (1997). Interactions of dietary levels of protein and energy on fingerling snakehead, *Channa striata*. *Aquaculture*, 156, 241–249.
- Sheu T.Y., Marshall R.T., Heymann H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J. Dairy Sci.*, 76, 1902-7.
- Sun Y.Z., Yang H.L., Ma R.L., Song K., Li, J.S. (2011). Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 18, 281–289.

Effects of dietary supplementation with encapsulation form of *Enterococcus faecium* on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Armin Abedian Amiri¹; Ghobad Azari Takami^{1*}; Mohammad Afsharnasab¹; Vadood Razavilar²

1- Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Food Quality Control, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author : takami85@hotmail.com

Received:2016/7/2

Accepted:2017/1/8

Abstract

This study examined the effects during 56 days of feeding of three dietary probiotics on growth performance and feed utilization, intestinal colonization and related health criteria in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). This study included 3 groups: a control group of fish, and fish fed with a basal commercial diet supplemented with 2.5×10^8 CFU g⁻¹ *Enterococcus faecium* strain IR5 (group 1) (was micro-encapsulated with sodium alginate) and 1×10^9 CFU g⁻¹ *Enterococcus faecium* strain IR5 (group 2) (was micro-encapsulated with sodium alginate) singularly in triplicate. 270 rainbow trout with an average weight of 35.6 ± 3.8 g (mean±SD) were obtained. Fish were acclimatized for 20 days. The probiotics groups showed improvement with respect to weight gain (WG), body weight index fish (BWI) (%), total length (TL), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER), lactic acid bacteria (LAB) (%) in intestinal, intestinal colonization (log CFU g⁻¹) and survival (%). At 28 days, group 2 showed improvement with respect to growth performance and feed utilization, intestinal colonization and related health criteria were higher than other groups. At 56 days, the WG and PER in the group 1 were significantly higher than in 2 and control groups (P<0.05). The LAB (%) in intestinal was higher in group 2 than in 1 and it was higher in group 1 than in the control groups after 8 weeks feeding (P<0.05).

Keywords: Rainbow trout, *Enterococcus faecium*, micro-encapsulation, Growth and health performance, feed utilization