فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال دوم/ شماره پنجم/ زمستان ۹۳/ صفحات ۴۰-۲۵

کارآیی باسیلوس‌های مستخرج‌شده از روده ماهی خاویاری انگشت قد فیل ماهی (*Huso huso*) بر روی مقاومت و فاکتورهای بیوشیمیایی بدن لاروکپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

محسن پورعباسعلی*[۱]، میترا اسماعیلی[۱]، شایان قبادی[۱]، حجت‌الله جعفریان[۲]، محمد قلی زاده[۱]

چکیده

سه مخلوط باکتریایی زیست‌یار شامل باسیلوسو مخمر، باسیلوس سابتلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلو سلیشنی فورمیس (*Bacillus lichenifirmis*) و مخمرساکارومایسیس سرویزیا (*Saccharomyces cerevisiae*) جدا شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*)، در سه سطح با غلظت‌های $۱/۵\times۱۰^{۶}$ و ۳×۱۰^{۶} و $۴/۵\times۱۰^{۶}$ CFU/gr (سلول درهر میلی لیتر) با غذا مکمل سازی شدند و توسط لارو ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه گردیدند. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار صورت پذیرفت. نرخ تغذیه بر اساس ۶-۵ درصد وزن بدن و ۳ بار در روز انجام شد. در پایان دوره (۳۵ روز)، از گروهی از ماهیان عصاره بدن گرفته شد و گروه دیگر توسط شوک های حرارتی (۴۰°C)، قلیائیت (pH=۱۲)، آمونیاک (۵mg/l) و اسیدیته (pH=۲) آزمایش گردیدند. در آزمایش مقابله با شوک حرارتی، بالاترین زمان زنده مانی در تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/gr بدست آمد. نتایج آزمایش‌های مقابله با استرس اسیدیته و آمونیاک نشان داد که تمامی تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند ($P<۰/۰۵$). در استرس قلیائیت بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی-داری مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$). نتایج حاصل از فاکتورهای بیوشیمیاییننشان داد که هیچ اختلاف معنی-داری بین تیمارها در میزان K^{+}, Ca^{+}, Na^{+} مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). اما بین تیمار شاهد با تیمار $۴/۵\times۱۰^{۶}$ در میزان قند خون اختلاف معنی‌داری وجود داشت($P<۰/۰۵$). و همچنین در مورد میزان کورتیزول،بین شاهد با تیمار ۳×۱۰^{۶} اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که زمان بقاء در برخی از آزمایش های مقابله با استرس و عصاره بدن وابسته به باکتری‌های زیست یار بود.

کلید واژه: باکتری‌های زیست‌یار، تست مقابله، لارو کپور معمولی (*Cyprinus carpio*).

۱- گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران mpourabasali@gmail.com

۲- گروهشیلات، واحد گنبد کاووس، دانشگاه آزاد اسلامی، گنبد، ایران

۱- مقدمه

پروبیوتیک‌ها بطور عمده تعریف می‌شوند به عنوان یک ارگانیسم یا ماده‌ای که در تعادل میکروبی روده شرکت می‌کند(پارکرو همکاران، ۱۹۷۴) و اغلب تحت عنوان یک پیش برنده‌ای که از راه طبیعی در پیشرفت وضعیت سلامت در ارگانیسم میزبان کمک می‌کند نامیده می‌شود. از بین محصولات پروبیوتیکی تجاری می‌توان از باسیلوس سیرکولانس (*B. circulans*)، باسیلوس سابتلیس(B.*subtilis*) و باسیلوس لیشنی فورمیس (*B. lichenifirmis*) نام برد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی گرم مثبت بوده که به صورت اسپور در بازار عرضه می‌گردند. بطور معمول از مخمرهای صنعتی در آبزی پروری استفاده می شود که هر یک از آنها به عنوان زیست‌یارهای زنده غذایی و یا به عنوان عناصر غذایی در تغذیه آبزیان بکار برده می‌شود.تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های زیست‌یار در آبزی‌پروری صورت گرفته و برخی از عملکردهای اثبات‌شده در خصوص این باکتری‌ها شامل دفع رقابتی برای سایر باکتری‌ها و همینطور بازدارنده-های پروبیوتیکی برای جلوگیری از کلنی‌شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده رشد دیگر باکتری‌ها و یا رقابت برای غذا و مکان و تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی را می‌توان ذکر کرد(Irianto and Austin, 2002 and 2003).

در مدیریت نوین میکروبی، گونه‌های بومی ایزوله‌شده از دستگاه گوارش آبزیان، کاربرد بسیار مهمی را در اهداف آبزی‌پروری ایفاء نموده است. یک تحقیق توسط Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ با باسیلوس سیرکولانس (*B.circulans*) ایزوله‌شده از روده ماهی روهو (*Labeo rohita*) در جیره‌های مکمل شده آنها صورت گرفت. همچنین باکتری لاکتوباسیلوس فروکتیورانس(*L. fructivorans*) ایزوله‌شده از شانک ماهی و نیز لاکتو باسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) ایزوله‌شده از مدفوع انسان، پس از غنی‌سازی با ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا در طی تغذیه، باعث افزایش رشد و بقاء این ماهی گردید (Gomez et al., 1998). آزمایش‌های انجام-شده نشان از تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر روی بهبود کارآیی رشد، بهره برداری غذایی، مقاومت در برابر بیماری و تحریک پاسخ ایمنی می‌باشد(Gomez et al., 1998). آزمایشات مقاومت در برابر استرس براساس قرار دادن لاروها در معرض یک وضعیت نامتعادل فیزیکی شیمیایی و زیستی و در یک دوره زمانی کوتاه مدت استوار است (Tackert et al., 1989). بر همین اساس مطالعه حاضر در راستای بکارگیری جیره‌های مکمل‌سازی شده با باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیشنی فورمیس و مخمر ساکارومایسیس سرویزیا با غلظت‌های $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/gr و ۳×۱۰^{۶} و $۴/۵\times۱۰^{۶}$در تغذیه لارو کپور معمولی و بررسی تأثیر این باکتری‌ها بروی ترکیبات بیوشیمیایی

لاروها و سپس قراردادن ماهیان در برابر استرس‌های محیطی(تست آمونیاک - تست بازی- تست اسیدی- تست دمایی) طراحی و اجرا گردید.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه باسیلوس‌های پروبیوتیکی

باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر مورد استفاده در این آزمایش از روده فیل ماهی انگشت قد (*Huso huso*) تهیه گردید. مخلوط دو باسیلوس سابتلیس و لیشنی فورمیس و مخمر ساکرومایسیس سرویزیا با غلظت (CFU/ml) $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ اسپور در هر میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی می‌باشد.

۳- مکمل‌سازی غذا

غذای استفاده شده در این آزمایش حاوی ۳۹/۷۴٪ پروتئین، ۹/۱۲ ٪ چربی، ۳۶ /۷ ٪ خاکستر، ۴۵۱۷ کالری بر گرم انرژی و ۹۱/۸۹ ٪ ماده خشک و ۱/۰۹ ٪ فیبر بود.

در پایان هر روز تلفات از تمام تکرارها جمع‌آوری و بطور دقیق شمارش و ثبت می‌شد. باقیمانده مواد غذایی با استفاده از میکرو پیپت از حوضچه ها جمع‌آوری شده و از کل غذای عرضه شده کسر و غذای خورده‌شده روزانه محاسبه گردید (Gatesoup, 1999). در این آزمایش لاروهای ماهی کپور معمولی به ترتیب از غذای مکمل‌سازی شده با مخلوط باسیلوس و مخمر با غلظت‌های $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/gr و ۳×۱۰^{۶} و $۴/۵\times۱۰^{۶}$تغذیه شدند. در تیمار شاهد تغذیه لاروهای کپور معمولی از غذای مکمل‌سازی نشده و بدون باکتری انجام گرفت.

باکتری‌های ایزوله شده از روده ماهیخاویاری انگشت قد در ابتدا در محیط کشت تریپتیک سوی آگار(TSA) کشت داده شد و سپس از کلونی‌های کشت داده شده در شرایط استریل، ۱۰ میلی‌متر از آن توسط آنس استریل برداشته و به اوپندورف حاوی یک میلی‌لیتر آب استریل منتقل گردید. نمونه توسط دستگاه شیکر بصورت هموژن در آمده و سپس به کوویتمنتقل شده و در دستگاه سانتریفیوژ با دور۵۰۰۰rpm برای مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژشده و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۱۰ نانومتر واحد کلونی‌های موردنظر در هر میلی لیتر باکتریایی تهیه شد((Gomez et al., 1998). مکمل‌سازی با باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر در اثر ترکیب کردن این باکتری‌ها با غلظت‌های $۱/۵\times۱۰^{۶}$CFU/gr و ۳×۱۰^{۶} و $۴/۵\times۱۰^{۶}$ در۱۰۰ گرم از غذای لاروها صورت پذیرفت. جیره‌های تهیه شده پس از یکنواخت‌سازی در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد (Nikoskelainen et al., 2003) به مدت ۱۲ساعت خشک شده و

پس از آن پلت‌ها را از الک‌های ریز چشمه (۱/۰میلی‌متری) عبور داده و ذرات غذایی مناسب با سایز دهان لاروها تهیه شد. جیره لاروهای ماهی در تیمار شاهد با همین روش ساخته شد ولی به آنها هیچگونه باسیلوس و مخمر پروبیوتیکی اضافه نگردید.

۴- طرح آزمایش

این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد که هر کدام دارای۴ تکرار بودند به مدت ۵ هفته، در تابستان سال۱۳۹۰ در سالن هیدروبیولوژی دانشگاه گنبد کاووس انجام پذیرفت. ماهیان با میانگین وزن تقریبی ۲۰۰ میلی‌گرم از سد وشمگیر تهیه و در حوضچه پلاستیکی با حجم آبگیری ۶ لیتر با هوادهی ثابت در میانگین دمایی۱±۲۲ درجه سانتیگراد، PH ۰/۳±۷/۸، شوری ۰/۵۰± ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، با میزان اکسیژن۰/۵± ۹ میلی گرم در لیتر و شرایط نوری۱۴ساعت روشنایی و۱۰ساعت تاریکی ذخیره‌سازی شدند. تغذیه لاروهای ماهی در مدت آزمایش، روزانه در ۳ نوبت در ساعت های ۷ ، ۱۳ و ۱۹ با غذایی که توسط پروبیوتیک باسیلوس و مخمر مکمل‌سازی شده بود انجام گرفت. نرخ تغذیه روزانه در لاروهای ماهی کپور به میزان ۶- ۵ درصد وزن بدن انجام شد.

۵- تست‌های استرس

پس از پایان آزمایش برای تعیین میزان مقاومت لاروهای ماهی دربرابر استرس بعد از تغذیه با پروبیوتیک آنها را در برابر دوزهای مختلفی از اسید (pH=۲) و باز (pH=۱۲) و آمونیاک (۵ mg/l) و دمای بالا (۴۰ ^{o}C) قرار داده و میزان مقاومت هریک از تیمارها سنجیده شد (جعفریان و همکاران، ۱۳۹۰).

۵-۱- تست pHپائین

در این آزمایش۱۰ قطعه لارو از هر تکرار صید شده و در معرض تست اسید قرار گرفتند. به این ترتیب که ۱۲ ساعت قبل از انجام این تست استرس غذادهی به ماهیان قطع شد. pH آب با بکارگیری اسید کلریدریک۳۷ ٪ به ۲ رسانده شد و ماهیان صید شده بطور همزمان در تشت آزمایش رهاسازی شدند. زمانی که آخرین ماهی به صورت کامل در این محلول کشته شد را ثبت کردیم وطول مدت زنده مانی ماهیان در این محلول‌ها تعیین گردید و به این ترتیب میزان مقاومت هریک از تیمارها را در برابر اسید مورد بررسی قرار گرفت.

۵-۲- تست pH بالا

در این آزمایش pH آب با استفاده از کریستال‌های سود(NaoH) به ۱۲ رسانده شد و پس از آن ۱۰ عدد ماهی از هر تکرار توسط ساچوک صید و در محیط استرسی قرار گرفت و میزان مقاومت هریک از آنها با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت.

۵-۳- تست استرس دمایی

تعداد ۱۰ عدد ماهی از هر تکرار صیدشده و ماهیان بطور همزمان در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بدین ترتیب میزان تحمل هریک از تیمارها در برابر دمای بالا مورد ارزیابی قرار گرفت.

۵-۴- تست استرس آمونیاک

برای انجام این تست از آمونیاک ۲۵ ٪ استفاده شد بدین صورت که میزان مقاومت هریک از تیمارها در برابر آمونیاک بالا (۵ mg/l) مورد مقایسه قرار گرفته شد.

۶- تهیه فاکتورهای بیوشیمیایی بدن لاروها

در نهایت تمامی جمعیت لارو ماهی از هر تکرار صید شده و پس از بیهوش‌سازی در عصاره پودر گل میخک (۱۰۰میلی‌گرم در لیتر)ماهیان را در هاون چینی به خوبی له کرده وسپس اجزای بدن را دردستگاه سانتریفیوژبا دور۵۰۰۰rpm برای مدت ۱۰ دقیقه (گومز و همکاران در سال ۱۹۹۸) قرار داده تا عصاره از سایر قسمت‌ها جدا گردد. عصاره بدن برای تعیین میزان قند – سدیم- کلسیم- پتاسیم و کورتیزول به آزمایشگاه ارسال شد. در آزمایشگاه میزان سدیم و پتاسیم با کمک دستگاه فلیم فتومتر (۱۰۸Hph) و سایر فاکتورها با دستگاه اتوآنالیزر(prestige۲۴i) اندازگیری شد.

۷- روش تجزیه و تحلیل

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست‌آمده از تست‌های استرس لاروهای ماهی در تیمارهای آزمایشی و شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم افزارSPSS و جدول تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOWA) و سپس مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد و برای ثبت داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری Excel استفاده شد.

۸- نتایج

۸-۱- تست دما

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تغذیه ماهیان با پروبیوتیک تأثیر مثبتی برروی مقاومت لاروها داشته بطوریکه کمترین میزان تحمل به افزایش دما با ۵۰/۳۳ ثانیه مربوط به تیمار شاهد و بیشترین میزان زنده مانی لاروها مربوط به تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$ با مدت زمان۶۱/۶۶ ثانیه بود و نتایج بدست آمده بیانگر وجود اختلاف معنی داری در تیمار شاهد با تیمارهای تغذیه شده با باسیلوس و مخمر است ($P<۰/۰۵$).

۸-۲- تست pH قلیایی

در این تست بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود داشت بطوریکه کمترین میزان تحمل به شرایط قلیایی در تیمار $۴/۵\times۱۰^{۶}$ به میزان ۲۸۷/۳۳ ثانیه و بیشترین مدت زمان زنده مانی لاروها مربوط به تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$ با مدت زمان ۴۰۷ ثانیه بود و بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$) .

۸-۳- تست آمونیاک

نتایج حاصل از این تست نشان داد که میزان تحمل ماهیان تغذیه شده از جیره‌های مکمل-سازی شده با مخلوط پروبیوتیک‌های باسیلوس و مخمر نسبت به ماهیان تغذیه نشده از این باکتری‌ها دارای تحمل بیشتری نسبت به افزایش آمونیاک بودند بطوریکه بالاترین مقاومت در تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$ با زمان ۷۴۰ثانیه و کمترین مدت زمان تحمل به آمونیاک در تیمار شاهد به مدت ۵۱۹ ثانیه بدست آمد واختلاف سطح بین تیمار شاهد با تیمارهای آزمایشی بصورت معنی‌داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$) .

۸-۴- تست pH اسیدی

نتایج حاصل از مقاومت و زنده مانی لاروها درمقابله با استرس پی اچ اسیدی بیانگر این است که مخلوط پروبیوتیک و مخمردر تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$، سبب افزایش زنده مانی به طور معنی-داری در این شرایط استرسی شده است ($P<۰/۰۵$) بطوریکه بیشترین زمان زنده مانی‌لاروها در برابر این استرس در تیمار $۴/۵\times۱۰^{۶}$ به مدت ۶۶/۶۳۶ ثانیه و کمترین زمان در تیمار $۱/۵\times۱۰^{۶}$ به مدت۴۸۷/۳۳ ثانیه بدست آمد.

جدول ۱. تغییرات مدت زمان بقاء لارو ماهی کپور تغذیه شده از جیره های آزمایشی در مقابله با استرس‌های مختلف

تیمار / نوع استرس (ثانیه)	شاهد	۱/۵×۱۰^۶ CFU/gr	۳×۱۰^۶ CFU/gr	۴/۵×۱۰^۶ CFU/gr
استرس دما	۵۰/۳۳±۸/۰۲^{b}	۶۱/۶۶±۰/۵۷^{a}	۵۹±۱/۰^{a}	۵۷/۶۶±۱/۵۲^{ab}
استرس قلیایی	۳۳۵/۶۶±۶۲/۹۷^{ab}	۴۰۷±۲۷^{a}	۳۹۱±۶۸/۷۲^{a}	۲۷۸/۳۳±۳۵/۹۲^{b}
استرس آمونیاک	۵۱۹±۱۳^{b}	۷۴۰±۲۸^{a}	۵۹۶±۳۷/۰۴^{ab}	۶۳۰±۱۷۵/۰۴^{ab}
استرس اسیدی	۵۰۱±۲/۶۴^{b}	۴۸۷/۳۳±۲۳/۶۹^{b}	۴۹۳/۳۳±۵۳/۹۲^{b}	۶۳۶/۶۶±۲۲/۵۴^{a}

تذکر: در هر ردیف اعدادی که دارای حروف غیر مشابه اند دارای اختلاف معنی‌داری هستند(P<۰/۰۵)

۹- ترکیبات بیوشیمیایی

تأثیرجیره‌های مکمل‌سازی شده با مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر بر ترکیبات عصاره بدن لارو کپور معمولی در جدول ۲ ارائه شده است. آزمایشات مشخص کرد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر در میزان سدیم پتاسیم و کلسیم بدن ماهی تأثیری نداشته و هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و گروه‌های آزمایشی وجود ندارد(P>۰/۰۵. بطوریکه بیشترین میزان سدیم ۱۲۴ mg/dl مربوط به تیمار۳×۱۰^۶ و کمترین میزان آن۱۱۸/۶۶mg/dl مربوط به تیمار۴/۵×۱۰^۶ بود. همچنین بیشترین مقدار کلسیم و پتاسیم به ترتیب در تیمارهای ۴/۵×۱۰^۶ و شاهد به میزان ۱۴/۴۵mg/dl و۶/۴۶mg/dlو کمترین میزان آنها در تیمار شاهد به مقدار۱۳/۶۱ mg/dl و در تیمار۴/۵×۱۰^۶ ۶/۱۶ mEq/l بدست آمد.

در مورد قند خون بین گروه شاهد و تیمار۴/۵×۱۰^۶ اختلاف معنی داری وجود داشت بطوریکه بیشترین مقدار قند خون در تیمار ۳×۱۰^۶ به میزان ۴۰۲ mg/dl و کمترین آن ۲۳۶mg/dl مربوط به تیمار۴/۵×۱۰^۶ بود و همچنین در مورد میزان کورتیزول بین شاهد با تیمار۳×۱۰^۶ اختلاف معنی داری وجود داشت (P<۰۵). بطوریکه بیشترین میزان این هورمون در تیمار شاهد ۸/۸۰ng/ml و کمترین مقدار آن در تیمار۳×۱۰^۶ به میزان ۳/۲۸ng/ml بدست آمد.

جدول ۲. تغییرات عصاره بدن لارو ماهی کپور تغذیه شده از جیره های پروبیوتیکی

تیمار / معیار	شاهد	۱/۵×۱۰^۶ CFU/gr	۳×۱۰^۶ CFU/gr
سدیم (mEq/l)	۱۲۰±۱/۰^a	۱۱۹/۳۳±۴/۹۳^a	۱۲۴±۳/۶۰^a
پتاسیم (mEq/l)	۶/۴۶±۰/۰۵^a	۶/۲۳±۰/۳۵^a	۶/۴۰±۰/۲۶^a
کلسیم (mg/dl)	۱۳/۶۱±۰/۱۰^a	۱۴/۱۶±۰/۴۹^a	۱۴/۰۶±۰/۷۳^a
قندخون (mg/dl)	۳۵۵/۵۰±۳۲/۵۰^ab	۲۷۱±۶۶^bc	۴۰۲±۷۵/۰۲^a
کورتیزول (ng/ml)	۸/۸۰±۱/۳۱^a	۷/۳۳±۴/۶۳^ab	۳/۲۸±۰/۶۲^b

تذکر: در هر ردیف اعدادی که دارای حروف غیر مشابه اند دارای اختلاف معنی‌داری هستند(P<۰/۰۵)

۱۰- بحث

در پرورش لاروی آبزیان بالا بردن توان مقاومت لاروها از اهمیت زیادی برخوردار است (ایریانتو، ۲۰۰۳). شواهدی وجود دارد که باکتری های زیست یار با تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش مقاومت آنها در برابر استرس‌های محیطی گشته و درصد بقاء را بالا می‌برند (Nikokskelainen et al., 2003; Wache et al., 2006). این باکتری‌ها با ترشح ترکیبات متابولیکی مختلف و تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش عملکرد آن شده و پاسخ‌های ایمنی ماهی را مقابل محرک های محیطی جهت تحمل بهتر آنها افزایش می دهند (Ghosh et al., 2003). اصولا پلی آمین‌های مترشحه از پروبیوتیکها ها موجب افزایش مقاومت میزبان در مقابله با استرسهای محیطی می گردد (Tackert et al., 2003) و مطمئنا پروبیوتیک‌ها اگر به آب اضافه شوند می‌توانند نقش مهمی را در تجزیه مواد آلی کاهش میزان نیتروژن و سطح فسفر بازی می‌کنند و به خوبی مقدار آمونیاک نیتریت و سولفید هیدروژن را کنترل می‌کنند (Ranigrahi et al., 2004).

عموماً در بین باکتری‌های پروبیوتیکی، باسیلوس‌های گرم مثبت بدلیل داشتن اسپور قابلیت بکارگیری بیشتری در ارتقا رشد لاروهای ماهی دارا می باشند. به همین دلیل کاربردهای بیشتری از آنها در تحقیقات مختلف دیده می شود (Gatsoup, 1999). لذا به همین دلیل از باسیلوس‌های استخراجی از روده فیل ماهی در این تحقیق استفاده گردید.پروبیوتیک‌های باسیلی در تحقیقات زیادی موجب افزایش پاسخ ایمنی در ماهیان شده و مقاومت ماهیان را در مقابله با استرس های

محیطی بالا برده است. در این تحقیق ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک و مخمر به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد مقاومت بیشتری را در برابر تست استرس دمایی نشان دادند. زمانی که ماهی در معرض افزایش دما قرار می‌گیرد از یک طرف شدت سوخت و ساز بدن بالا رفته و نیاز اکسیژنی ماهی افزایش می‌یابد و از طرف دیگر با افزایش دمای آب میزان اکسیژن محلول در آب کاهش می یابد پس در واقع با قرار گرفتن ماهی در برابر استرس دما ماهی در معرض کاهش اکسیژن قرار می‌گیرد(نیرومند و همکاران، ۱۳۸۹) و شاید مقاوم تر بودن ماهیان تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل به دلیل تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بروی کیفیت آب پرورش است.

اسیدی میزان مقاومت ماهیان تیمارهای پروبیوتیکی از تیمارشاهد بیشتر بود و در محیط pH همچنین در آزمایش استرس اسیدی حلالیت فلزات سنگین مانند آهن و قرار گرفتن آنها بروی آبشش ماهی و به تبع آن کاهش تبادلات اکسیژنی بوقوع می‌پیوندد(نفیسی بهابادی، ۱۳۸۵). در استرس pH قلیایی بین تیمارهای شاهد و پروبیوتیک ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. آمونیاک مهمترین ماده دفعی حاصل از متابولیسم است. این ماده از آبشش‌ها و کلیه به محیط آب دفع می شود. اگر محیط اسیدی باشد آمونیاک به یون آمونیوم بی‌خطر تبدیل شده اما اگر محیط قلیایی باشد آمونیاک در محیط آبی باقی می ماند و توانایی آبشش‌ها در دفع آمونیاک کاهش می-یابد و به دنبال آن غلظت آمونیاک در خون ماهی بالا رفته و تبادل اکسیژنی نیز کاهش می‌یابد و در پی آن نیاز اکسیژنی بافت‌ها را بدنبال خواهد داشت(نفیسی بهابادی، ۱۳۸۵).

در مشابهت با نتایج بدست آمده در این تحقیق، لشگر بلوکی در سال ۱۳۹۰با بکارگیری عصاره مخمر ساکرومایسیس سرویزیا تحت عنوان ماده تجاری A-maxدر غنی‌سازی با دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) در تغذیه تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*) دریافتند که این مخمر توانست مقاومت لاروهای این ماهی را در تست مقابله با استرس دمایی و پی اچ قلیایی، اسیدی، آمونیاک در حد معنا داری نسبت به گروه شاهد بالا برد. در ارتباط با استرس pH قلیایی مدت زمان زنده مانی در گروه شاهد ۱۱۷ ثانیه بود که در تیمارپروبیوتیکی این مدت به ۱۷۸ ثانیه ارتقا یافت. همچنین مدت زمان تحمل لاروها به استرس اسیدی و آمونیاک و دمایی در گروه شاهد به ترتیب ۶۵،۲۲۷و ۱۳۶ ثانیه، اما در گروه‌های پروبیوتیکی ۳۶۴، ۸۹و۲۵۵ ثانیه بدست آمد(لشگر بلوکی، ۱۳۹۰).

همچنین درتحقیق مشابه دیگری معین فرامرزی درسال۱۳۹۰با غنی‌سازی دافنی ماگنا(*Daphnia magna*) با باسیلوس سیرکولانس (B.circulans) و باسیلوس لیشنی فورمیس(B.lichenifirmis)در تغذیه لاروهای تاس ماهی ایرانی دریافتند که این محصول

پروبیوتیکی سبب افزایش زنده مانی لاروها در برابر استرس‌های دمایی، قلیایی، اسیدی و آمونیاک شده و در تمامی این استرس‌ها اختلاف معنی داری بین گروه شاهد با تیمارهای آزمایشی وجود داشته است، بطوریکه بیشترین میزان تحمل به استرس اسیدی در تیمار ۳ با غلظت CFU/ml ۶×۱۰^{۷} با مدت زمان ۳۷۸ ثانیه در برابر ۲۷۶ ثانیه تیمار شاهد بدست آمد. همچنین در استرس دمایی بالاترین زمان زنده مانی در تیمار ۳ با غلظت CFU/ml ۶×۱۰^{۷} با مدت زمان ۱۶۸ ثانیه و کمترین زمان زنده مانی در تیمار شاهد۵۲، ثانیه بدست آمد. در استرس آمونیاک و قلیائیت بیشترین زمان‌ها مربوط به تیمار ۳ با غلظت CFU/ml ۶×۱۰^{۷} با مدت زمان‌های ۳۸۱ ثانیه و۲۰۲ ثانیه اما کمترین زمان‌ها در تیمار شاهد با ۱۳۵ و ۱۲۰ ثانیه بدست آمد. همچنین جعفریان و همکاران در سال ۱۳۹۰ با بکارگیری باسیلوس سابتیلیس و لیچنی فورمیس از محصولات تجاری شرکت پروتکسین و نیز لاکتو باسیل‌های تجاری شامل لاکتو باسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) و لاکتوباسیلوس دلبروکی (*L. delbrueki*) و همچنین باسیلوس‌های ایزوله شده از دستگاه گوارش تاس ماهی ایرانی شامل باسیلوس مایکودیس (*Bacillus mycodis*) و جنس کورینه باکتریوم (*Corynebacterium sp.*) در مکمل سازی با جیره‌های ماهی قزل آلا دریافتند که این پروبیوتیک های باسیلوسی و لاکتو باسیلوسی موجب افزایش میزان مقاومت و زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در مقابله با استرس‌های pH قلیایی، اسیدی، دمایی و آمونیاک شدند. در تست حرارت نتایج این آزمایش نشان داد که لاروهای کپور معمولی در تیمار تغذیه شده با غذای حاوی باسیلوس‌های پروبیوتیکی با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر گرم،زمان زنده مانی ۶۱/۶۶ ثانیه بدست آمد در حالیکه جعفریان و همکاران مشخص کردند که این مدت زنده مانی برای لارو قزل آلای رنگین کمان در استرس دمایی (۳۳ درجه‌سانتی‌گراد) برای گروه لاکتوباسیل-های پروبیوتیکی۷۶ ثانیه، در ارتباط با باسیلوس‌های تجاری ۹۴ ساعت و برای باسیلوسهای بومی ایزوله شده ازروده ماهیان خاویاری ۸۲ ساعت تعیین گردیده است. این نتایج در مشابهت با نتایج بدست‌آمده از تحقیق حاضر بود و پروبیوتیک‌های باسیلی موجب ارتقا مقاومت و مدت زنده مانی لاروهای ماهی گردیدند. بیشتر پروبیوتیک‌های استفاده شده در آبزی پروری از انواع باسیلوس و مخمرها می باشند (Wang, 2007) در مشابهت با نتایج این تحقیق مطالعه صورت گرفته توسط جعفریان در سال ۱۳۸۵ باسیلوس‌های پروبیوتیکی توان مقاومت لاروهای تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*) را در برابر استرس شوری افزایش دادند (جعفریان،۱۳۸۳). آذری تاکامی و همکاران در سال ۱۳۸۳ تعیین نمودند که افزودن باسیلوس سیرکولانس (*Bacillus circulans*) و باسیلوس سابتیلیس (*B. subtilis*) از گروه باکتری‌های زیست یار به استخرهای پرورش میگوی سفید هندی(*Fenneropenaeus indicus*) موجب کاهش میزان آمونیاک شد

ولی تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت در حالیکه میزان اکسیژن محلول در استخرهای تحت تاثیر این باسیلوس‌ها بطور معنی داری افزایش یافته بود و توانایی بهره برداری بهینه از آب و افزایش تولید را نیز به همراه داشت. همچنین استفاده از دو سویه باکتری پروبیوتیکی در جیره غذایی بچه ماهی نورس شانک دریایی(*Sparus aurata*), تلفات تجمعی بچه ماهیان را به هنگام پاسخ به استرس pH بطور معنی‌داری کاهش داد (Overloo et al., 2006).

در تحقیقی مشابه مخمر ساکارومایسیس سرویسیا در تغذیه نوزاد تیلاپیای نیل بکار رفت و نتایج نشان داد که عملکرد تغذیه‌ای شامل نرخ تغذیه، راندمان پروتئین و انرژی در تیمارهای تحت تاثیر مخمر در مقایسه با ماهیان تیلاپیا در تیمار شاهد افزایش یافت، همچنین در تیمارهای آزمایشی میزان تلفات نوزادان ماهی در تست مقابله با باکتری آئروموناس هیروفیلا *(Aeromonas hydrophila)* در مقایسه با شاهد بطور معنی داری کاهش یافت (Ghosh et al., 2002 b). از جمله مکانیزم‌های مهم در خصوص افزایش مقاومت در لاروهای آبزیان در تأثیرپذیری از باکتری‌های زیست یار، افزایش فعالیت لیزوزیمی (***Lysozyme activity***) سرم ماهی و ایمونوگلوبین می باشد که در طی فعالیت‌های متابولیکی این باکتری‌ها صورت می‌پذیرد که موجب ارتقاء سیستم ایمنی ماهی می‌گردد. در تأیید یافته‌های این تحقیق، بالکازار و همکاران نشان دادند که زیست یارهای لاکتوباسیلی موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) و فعالیت لیزوزیمی سرم ماهی شده و سیستم ایمنی ماهی و نرخ بقاء بالاتری را به‌همراه داشت (Balcazar et al., 2007). این شواهد نشان می‌دهند زیست یارها در افزایش فعالیت سیستم ایمنی ماهیان و مقاوم سازی آنها در مقابل عوامل بیماریزا و محرک‌های محیطی تأثیر بسیار مثبتی را از خود نشان می‌دهند و میزان این اثرگذاری بر مبنای سویه باکتری و غلظت‌های بکارگیری آنها متفاوت می‌باشد. در همین خصوص پانیگراهی و همکاران اثبات نمودند که فعالیت لیزوزیمی سرم ماهی قزل آلای رنگین کمان با بکارگیری لاکتوباسیلوس رامنوسوس *(Lactobacillus rhamnosus)* افزایش یافت (Panigrahi et al., 2004)

در این تحقیق باسیلوس‌های زیست یار و مخمر در آزمایش مقابله با استرس‌ها، مقاومت لاروهای ماهی را در تحمل به استرس‌ها بالا برد و طول مدت زنده ماندن آنها را افزایش دادند. در موافقت با این نتایج باسیلوس تویوئی (*Bacillus toyoi*) میزان بقا لارو ماهی کفشک (*Scophthalmus maximus*) را در حد معنی داری افزایش داد (Gatsoupe, 2007) همچنین Carnevali و همکاران در سال ۲۰۰۴ در استفاده از لاکتوباسیلوس فروکتیورانس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم نتایج خوبی را در افزایش بقا لارو شانک ماهی بدست آوردند (کارنوالی و همکاران، ۲۰۰۴). باسیلوس سیرکولانس بکار رفته در جیره ماهی روهو درصد بقا را از ۸۱/۶۶

به ۹۷/۳۳درصد افزایش داد (Ghosh et al., 2002 b). در مغایرت با این نتایج wach و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز گزارش دادند که جیره غذایی حاوی ساکرومایسیس سرویسیا سویه بولاردی تأثیر قابل توجهی بر مرگ و میر و تلفات بچه ماهیان نورس قزل آلای رنگین کمان نداشت (واچ و همکاران ،۲۰۰۶). تأثیرگذاری باکتری‌های زیست یار درخصوص ارتقاء معیارهای رشد و افزایش بقاء در ماهیان پرورشی، در تحقیات زیادی به اثبات رسیده است (Gatsoup, 1999). عملکرد متفاوت باکتری های پروبیوتیکی بر افزایش معیارهای رشد و مقاومت در لاروهای ماهی بر مبنای گونه باکتری متفاوت بوده و مواردی نظیر ژنتیک، تغذیه و فاکتورهای محیطی می‌تواند در این عملکرد تأثیر بگذارند (Gatsoup, 1999). پروبیوتیک‌ها از یک سو با بهینه‌سازی فاکتورهای کیفی آب موجب ایجاد شرایط مناسب زیستی برای آبزیان پرورشی شده و از سوی دیگر با ترشح برخی مواد خارج سلولی از جمله آنزیم‌های گوارشی موجب هضم و جذب بهتر مواد غذایی خورده شده توسط آبزی می‌شود (Moriarty, 1998). همچنین با تحریک سیستم ایمنی ماهیان میزان بقا را تا حد زیادی افزایش می‌دهند (Tackert et al., 1989).

باتوجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق میزان هورمون کورتیزول در تیماری که از پروبیوتیک تغذیه نشده بود دارای بالاترین مقدار بود و در گونه هایی که پروبیوتیک دریافت کرده بودند این هورمون کاهش یافته بود که نشانگر تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها در کاهش میزان ترشح این هورمون و کاهش میزان استرس است. باتوجه به آزمایشات انجام شده توسط Barton در سال ۱۹۹۱ وWendebolarدر سال ۱۹۹۷ میزان تغییرات کورتیزول بطور معمول به‌عنوان یک نشانگر از میزان استرس تجربه شده توسط ماهی می‌باشد (بارتون۱۹۹۱،و وندلار، ۱۹۹۷). در این آزمایش مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر در لاروهای کپور معمولی موجب کاهش میزان کورتیزول شده که بیانگر تأثیر مثبت آنها در این ماده بوده است و در مشابهت با این نتایج کارنیوالی وهمکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند که بکارگیری لاکتوباسیلوس دلبروکی (*L.delbrueki*) در جیره‌های باس دریایی (*Dicentrachus labrax*) موجب گردید، سطح کورتیزول ترشحی در خون این ماهی در تیمارهای تحت تأثیر این لاکتوباسیلوس‌ها در مقایسه با تیمار شاهد از میزانng/g۵/۱به ng/g۳/۶ کاهش یابد.

هورمون کورتیزول در اثر استرس‌های مختلفی که به موجود وارد می شود تحریک و ترشح می گردد. تقریباً هر نوع استرسی موجب افزایش فوری و بارز در ترشح ACTH و بدنبال آن در ظرف چند دقیقه منجر به افزایش شدید در ترشح کورتیزول از قشر فوق کلیوی می‌شود. یکی از آثار متعدد هورمون کورتیزول بالا بردن مقاومت بدن در هنگام استرس بوسیله کاهش جذب

گلوکز و تشدید نیاز به سدیم و آب بدن می باشد(حافظ امینی و همکاران، ۱۳۸۱).

در موافقت با نتایج این مطالعه، در یک تحقیق پانگراهی و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس(*L.rhamnosus*) در جیره ماهی قزل آلای رنگین کمان (*myksis Oncorhynchus*) با غلظت 10^9 CFU/g موجب ارتقا فاکتورهای خونی در مقایسه با گروه شاهد گردید و بدین ترتیب مشخص شد که بکارگیری پروبیوتیک موجب افزایش برخی از فاکتورهای خونی در ماهیان می گردد.

قند خون یکی از عوامل مهمی است که معمولاً تحت تأثیر هورمون‌ها و کنترل هورمونی است و افزایش میزان استرس و ترشح هورمون کورتیزول می‌تواند بر گلوکز پلاسمای ماهی اثر گذار باشد(حافظ امینی و همکاران، ۱۳۸۱). Barnhart و همکاران در سال ۱۹۶۹ گونه ماهی را از عوامل مهم و مؤثر بر میزان گلوکز سرم خون ذکر نموده است که در این تحقیق میزان قند خون کپور معمولی ۴۰۲mg/dl بدست آمده است.

Thrall وهمکاران در سال ۲۰۰۴ میزان طبیعی کلسیم سرم خون ماهیان پرورشی را صرف نظر از گونه ماهی برابر mg/dl ۲۰ ذکر کرده است (ترال و همکاران ، ۲۰۰۴) که نتایج بدست آمده از این مطالعه درمقایسه با عدد بدست آمده توسط Thrall پائین‌تر بود.Sanoدر سال ۱۹۶۰ سطح کلسیم را در تابستان بالاتر از زمستان گزارش داد و این تغییرات را مرتبط با افزایش و کاهش نور خورشید ودمای محیط ذکر کرده است. وی معتقد است سطوح کلسیم سرم تحت تأثیر آب نیست و ممکن است کلسیم جیره غذایی از عوامل موثر بر کلسیم خون می‌باشد Thrall و همکاران در سال ۲۰۰۴ میزان سدیم و پتاسیم را در ماهیان آب شیرین به ترتیبmEq/l ۱۵۰, ۳ گزارش نمودند که در مطالعه حاضربالاترین میزان سدیمmEq/l ۱۲۴و پتاسیم ۶/۴۶mEq/lبدست آمده است.

یک راهبرد جدید در فعالیت‌های آبزی پروری این است که می‌توان همسو با ساختارهای بوم شناختی با مدیریت نوین میکروبی نسبت به افزایش سازگاری اکولوژیکی آبزیان اقدام نمود. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که سطوح متفاوتی از سوسپانسیون پروبیوتیکی باسیلوس و مخمر نانوایی توانایی های مختلفی را در تأثیرگذاری بر میزان ترکیبات عصاره بدن و هورمون کورتیزول و مقاومت لاروهای ماهی کپور معمولی در مقابل محرک‌های استرس‌زای محیطی داشته وبرحسب غلظت‌های مختلف مورد استفاده این تأثیر متفاوت می‌باشد.

فهرست منابع

۱. **آذری تاکامی، (۱۳۸۴)**.بررسی اثرات تغذیه‌ای ناپلیوس‌های (*Artemia urmiana*) غنی‌شده با ویتامینCروی رشد,درصد بقا و مقاومت دربرابر استرس‌های محیطی در لاروهای قزل-آلای رنگین. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۶۶:ص ۳۲-۲۵.

۲. **حافظ امینی، پ.عریان،ش.پریور، ک. ۱۳۸۱)**.بررسی اثرات ناشی از استرس کلرورسدیم روی قند خون و هورمون کورتیزول در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران،۱۳۸۲،شماره ۳،صفحه۳۵-۴۲.

۳.**جعفریان، ح. (۱۳۸۵)**. تأثیر باکتری‌های باسیلوسی به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی درلارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)درطول دوره پرورش لاروی ازطریق غنی سازی با آرتمیا اورمیانا(*Artemia urmiana*). پایان نامه دکترا. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. صفحه ۱۰۳.

۴. **جعفریان،ح. سلطانی ،م. طاعتی،م. نظرپور،ع. مروت،ر. (۱۳۸۸)**. مقایسه تاثیر باسیلوسهای مستخرج شده از روده لارو ماهیان خاویاری Acipenser Persicusو Huso husoبا پروبیوتیک‌های تجاری بر رشد و بقا لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان(Oncorhynchus myksis). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰،دوره ۶۶،شماره ۱، صفحه ۳۹-۴۶.

۵. **فرامرزی،م. (۱۳۹۰)**. غنی سازی دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) با باسیلوس سیرکولانس و باسیلوس لیشنی فورمیس جهت ارتقا معیارهای رشد و تغذیه، نرخ بقا و مقاومت در برابر استرسهای محیطی و کاهش ترشح میزان ازت آمونیاکی در لارو تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus*).پایان نامه ارشد.دانشگاه گنبدکاووس.صفحه ۵۱.

۶ .**لشگربلوکی،م. (۱۳۹۰)**. تاثیر فرآورده مخمری ای- مکس (A-max) بر ارتقا ترکیبات شیمیایی بدن و معیارهای تغزیه لارو تاس ماهی ایرانی از طریق غنی سازی دافنی ماگنا.پایان نامه ارشد.دانشگاه گنبدکاووس.صفحه ۸.

۷. **نفیسی بهابادی، م**..راهنمای عملی تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان. انتشارات دانشگاه هرمزگان , تهران.

۸. **نیرومند،م. سجادی،م.یحیوی،م.اسدی،م.(۱۳۸۹)**. تاثیر سطوح مختلف بتائین بروی مقاومت بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان(*oncorhynchus myksiss*) در برابر استرس های محیطی.مجله آبزیان و شیلات,۱۳۸۹,دوره ۴,صفحه ۶۳-۷۱ .

9.**Balcazar, J. L., Balas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C.,**

Marques, I., Girons, O., Muzquiz. L. (2007). Changes in itestinal microbiota and imune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*).British Journal of Nutrition. 97: 522-527.

10.**Barnhart, R.A. (1969).** Effect of certain variable on hematological characterisistics of rainbow trout.Trans. Am. Fish. Soc. 3: 412-418.

11.**Barton, B.A.,(2002)**. A diversity of responses with particulararefrence to changes in circulating corticosteroids.

12. **Barton,B.A.,C.B.Schreck, andl.A.Sigismondi.(1987**). Changesin plasmacortisol during stress and smoltification in oncorhynchuskisutch.

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

14. **Gatesoupe, F. J. (1999)**. Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180:147-165.

15. **Gatesoupe, F.J. (2007).** Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquaculture. 267: 20–30.

16. **Ghosh, k., Sen, S.K. Ray, A. K. (2002a).** Characterization of Bacillus Isolated from the gut of Rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion . Appl. Aquaculture. 12:33-42.

17. **Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A. K. (2002b).** Growth andsurvival of rohu , Labeo rohita (Hamilton ,1822)spawn feed diets formented with intestinalbacterium, Bacillus circulans. Acta.Ichthyo. Pistor.32(2):83-92.

18. **Ghosh, K., Sen, S.K., and Kumar Ray, A., (2003)**. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *bacillus circulans*, in Formulated diets for Rohu, Labeo rohita, Fingerlings. Aquacu lturebamidgeh. 55(1): 13-21.

19.**Gomez- Gil, B., Herrera- Vega, M. A., Aberu-Grobis, F.A., Roque, A. (1998)**. Bioencapsulation oftwo different vibrio species in nauplii of the Brineshrimp (*Artemia fransiscana*). Appl. Environ.microbiol.64:2318-2322.

20.**Irianto , A., Austin, B. (2002).** Probiotic in aquaculture , Journal of Fish Diseases .25 :1-10 .

21..**Irianto, A., and Austin, B., (2003)**. A short communication: use of dead probiotic cells to control

22..**Moriarty, D.J.W. (1998**). Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture pond. Aquaculture.164: 351-358.

23. **Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S. Lilius, E. M. (2003).** Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish & Shell fish Immonology. 15: 443-452.

24**. Noh, S.H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J. (1994).**Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp.Korean J.Anim.Sci. 36:480-486.

25.**Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S. Lilius, E.**

M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish & Shell fish Immonology 15:443-452.

26.**Parker RB. (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health,29:4e8.

27. **Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. Sugita, H. (2004).** Immune responses in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology. 102: 379-388.

28. **Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A., and Carnevali,O. (2006)**. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. FishPhysiology and Biochemistry. 32: 167-177.

29. **Sano, T. (1960).** Haematological studies of the culture fishes in Japan 2. Seasonal variation of the blood constituents of rainbow trout. J. Tokyo Univ. Fish., 46: 67-75.

30. **Strange. E. Davis, D. (1984**). The stress respense in fish,Department of biology, Ecological Research Center. USA.

31. **Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W.,Denicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., Rebar, A. and Weiser, G. (2004).** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wikins, USA., pp. 501.

32. **Tackert, W., Abelin, P., and Sorgeloos, P. (1989).** Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feeding procedure, J. World. Aquacult. Soc., 20.74A.

33. **Tovar-Ramirez, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez-Juarez, R., and Lésel, R. (2002**). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. 204:113-123.

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

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

36. **Wendelaar Bonga. (1997)**. Effect of stocking density onbiological Parameters and The Stress in fish, Department ofAnimal Physiolog, University of Nijemegan, The Netherland.