فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال دوم/ شماره دوم/ بهار۹۳/ صفحات۴۸-۳۵

بررسی اثر مکمل میکروبی باکتوسل بر شاخص‌های رشد و بقا و فاکتورهای ایمنی در بچه ماهی سفید*(Rutilus frisii kutum)*

الهام رستنده*[۱]، مهدی شمسایی[۲]، شهرام بهمنش[۳]، ژیلا نیک‌پور[۴]

چکیده

برای بررسی اثر مکمل میکروبی باکتوسل بر شاخص رشد و بقا و فاکتورهای ایمنی در بچه ماهی سفید(Rutilus frisii kutum) ، تحقیقی صورت گرفت که در آن اثر ۴ تیمار آزمایشی حاوی سطوح صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک باکتوسل برکیلوگرم غذای ماهی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش طی مهر تا آذر ماه ۱۳۹۲ در ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی خجیر واقع در شرق تهران به اجرا در آمد و طی آن۶۰۰ بچه ماهی سفید با میانگین وزن اولیه۰/۲ ± ۳ گرم، طی یک دوره ۶۰ روزه توسط جیره‌های آزمایشی که هر یک واجد سه تکرار بودند، مورد تغذیه قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از این مکمل میکروبی، تأثیر محسوسی بر رشد طولی و وزنی بچه ماهیان ایجاد نکرد (p>۰/۰۵) بررسی پارامترهای خونی بیانگر افزایش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز خون با استفاده از پروبیوتیک باکتوسل درجیره های غذایی بود. بررسی گلبول های سفید خون، بیانگر افزایش معنی‌دار تعداد آنها همزمان با استفاده از پروبیوتیک باکتوسل بود (p<۰/۰۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌های خونی و آزمون دانکن آنها بیانگر افزایش معنی‌دار لیزوزیم، لنفوسیت‌ها و IgM بود (p<۰/۰۱). همچنین طی دوره ۶۰ روزه آزمایش تلفاتی مشاهده نشد.

کلید واژه: ماهی سفید(*Rutilus frisii kutum*)، باکتوسل، پروبیوتیک، رشد، فاکتورهای ایمنی، فاکتورهای خونی.

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان ، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران (نویسنده مسؤول) elham.rastandeh@yahoo.com

۲-گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران.

۳- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، مرکز تحقیقات شیلاتی بندر انزلی، بندرانزلی، ایران.

۴-گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فنون، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۱- مقدمه

امروزه کاربرد مکمل‌های میکروبی در آبزی پروری توسعه‌یافته است. چراکه برخی از این مکمل‌ها مانع از بروز بیماری و تلفات در میان ماهیان شده‌اند. این مواد بازده استفاده از خوراک را بهبود می بخشند که این امر از طریق ارتقا فرآیند هضم و جذب در دستگاه گوارش و تغییر فلور میکروبی روده، محقق می گردد. استفاده از پروبیوتیک ها در طول دوره پرورش آبزیان منجر به افزایش بازده خوراک، تأمین احتیاجات غذایی ماهی و صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی و تغذیه‌ای می گردد(Fuller, 1989).

پروبیوتیک‌ها مکمل های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده، تأثیرات سودمندی بر میزبان دارند. پروبیوتیک‌ها باکتری‌های سودمندی هستند که به فراوانی در درون دستگاه گوارش موجودات زنده به سر می‌برند. این موجودات زنده، هضم و جذب موادغذایی دستگاه گوارش دام، طیور و آبزیان را سامان می‌دهند و در دستگاه گوارش با بالابردن سطح مقاومت و ایمنی شرایط استقرار و زندگی را برای باکتری‌های بیماری زا دشوار می‌کنند(Farzanfar, 2006). از میان پروبیوتیک‌ها، باکتوسل به عنوان یک زیست یار حیاتی یکی از انواع باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که از سویه باکتری *Pedicococus Acid Lactici MA* تشکیل شده و حاوی تعداد 1×10^{-15}cfu/g باکتری از سویه مذکور است(Fuller,1989).

باکتوسل پروفایل میکرو فلور روده را به سمت افزایش باکتری های مفید و حذف باکتری‌های بیماری زا پیش برده و تعداد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک را افزایش می‌دهد (Austin *et al.*, 1995). در عین حال ماهیان استخوانی دریای خزر از جمله منابع ارزشمند ملی و منطقه ای هستند که از لحاظ بوم شناسی،زیست‌شناسی و اقتصادی حائز اهمیت می‌باشند در این میان، ماهی سفید از جایگاه ویژه ای برخوردار است و بیشترین مقدار صید ماهیان استخوانی دریای مازندران را به خود اختصاص می‌دهد. در طی سال‌های اخیر استفاده از مواد افزودنی در خوراک این آبزی به شدت مورد توجه متخصصین تغذیه آبزیان واقع شده است.ماهی سفید (***Rutilus frisii kutum***) از خانواده کپور ماهیان می باشد. این ماهی در رده ماهیان استخوانی، راسته کپور ماهی شکلان، خانواده کپور ماهیان، جنس ماهی سفید و گونه ماهی سفید می‌باشد(FAO , 2012).

عمده پراکنش ماهی سفید در دریای خزر، مربوط به مناطق جنوبی و جنوب غربی این دریا بوده و از رودخانه اترک واقع در منطقه قفقاز تا سواحل جنوب ترکمنستان ماهی سفید یک ماهی اقتصادی ارزشمندقلمداد می گردد(FAO , 2012) با توجه به اهمیت تجاری ، بازار پسندی و جایگاه ویژه این ماهی در ایران و همچنین طولانی بودن دوره رشد آن تا رسیدن به اندازه بازارپسند، شاید استفاده از مکمل غذایی مانند باکتوسل در تغذیه ماهی سفید بتواند باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی(FCR) و

بهبود شاخص‌های ایمنی آن گردد. لذا در این پروژه بررسی اثرات مکمل غذایی باکتوسل بر افزایش رشد و بقا وهمچنین افزایش ایمنی ماهی سفید مدنظر قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش به مدت ۶۰ روز در ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی خجیر واقع در شرق تهران به اجرا درآمد. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی تکراردار با چهار تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش را مقادیر۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم مکمل غذایی- میکروبی باکتوسل بر کیلو گرم غذا تشکیل می دادند. تعداد کرت های لازم برای آزمایش ۱۲ عدد بود که آکواریوم هایی با ابعاد۴۰×۵۰× ۱۵۰سانتی متر برای این کار لحاظ گردیدند. بچه ماهی‌های مورد استفاده در هر کرت ۵۰ عدد بود که در مجموع ۶۰۰ عدد بچه ماهی سفید با وزن اولیه ۳ گرم برای انجام این آزمایش ازمرکز تحقیقات شیلاتی بندر انزلی تهیه گردیدند. غذای مورد استفاده در این آزمایش از شرکت کیمیاگران تغذیه تهیه شد. غذای مورد استفاده با اندازه قطر ۲ میلی متر عرضه می گردد که به روش اکستروژن تهیه می شد. برای افزودن مکمل باکتریایی باکتوسل به خوراک ابتدا مکمل مذکور به میزان مورد نیاز هر تیمار توسط ترازوی دیجیتالKEREN(EG220-3NM) ساخت آلمان با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید و در ۱۰ cc آب خالص حل می‌گردید. سپس محلول حاصل توسط دستگاه اسپری، به سطح یک کیلوگرم غذا پاشیده می‌شد و با زیرو رو کردن غذا امکان تماس تمامی دانه‌های غذایی با مکمل فراهم می‌گردید. سپس خوراک در سطح سینی‌های تمیز پراکنده شده و در دمای اتاق در سایه خشک می گردید. به این ترتیب غذا برای هر سه تیمار اصلی آزمایش فراهم گردید. در تیمار شاهد نیز که فاقد مکمل میکروبی بود، فقط از اسپری کردن ۱۰cc آب خالص استفاده گردید. عملیات ساخت غذا ۲۴ ساعت پس از معرفی بچه‌ماهی‌ها به واحدهای آزمایشی انجام گرفت.۷۲ ساعت پس از معرفی بچه ماهیان به کرت‌ها اولین غذادهی صورت گرفت. میزان غذای مصرفی بچه‌ماهی‌ها با توجه به وزن اولیه آنها، روزانه معادل ۵ درصد وزن بدن آنها در نظر گرفته شد که این میزان روزانه طی چهار نوبت با فواصل زمانی برابر در اختیار آنها قرار می گرفت. تغییرات مقدار غذا طی دوره‌ی پرورش، بر اساس تغییرات وزنی ماهی‌ها و زیست‌سنجی‌های انجام شده، صورت می‌گرفت. با توجه به اهمیت عوامل مختلف محیطی در پرورش بچه ماهیان، برخی از این عوامل همچون دما، اکسیژن محلول و pH آب توسط دستگاه WTW به صورت روزانه اندازه‌گیری و کنترل می‌شد و میانگین آنها پس از زیست سنجی ثبت می‌شد.

برای حمل ماهیان از کیسه‌های پلاستیکی به قطر ۴۰ سانتیمتر و عمق ۹۰ سانتیمتر در حالیکه به نسبت یک به سه از آب و اکسیژن خالص پرشده بودند، استفاده گردید. به هر کیسه پلاستیکی ۱۰۰

عدد ماهی(با میانگین وزن ۳ گرم) معرفی شده و کیسه‌ها در درون جعبه‌هایی از جنس یونولیت قرار می گرفتند. برای تثبیت دما، بستر جعبه ها با پودر یخ و خاک اره چوب پوشانده می شد سپس جعبه - ها، به محل آزمایش منتقل گردیدند. ماهیان در محل آزمایش بعد از حدود دو ساعت هم دما سازی با آب محل آزمایش، به درون آکواریوم‌های آزمایشی رها شدند. منبع تأمین آب آکواریوم‌ها چاه بود، برای هر آکواریوم یک بخاری در نظر گرفته شده بود ضمن این که دمای هوای محل نگهداری آکواریوم‌ها نیز ۱۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، یک پمپ هوای مرکزی نیز برای هوادهی به آکواریوم‌ها لحاظ شده بود تا سطح اکسیژن آب ثابت بماند. تغذیه بچه ماهی‌ها ۴۸ساعت پس از رهاسازی آنها آغاز و تا دو ماه ادامه یافت.

ماهیان مورد آزمایش از لحاظ وزن، طول و مشخصات ظاهری هر پانزده روز یکبار یعنی در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ دوره آزمایش مورد زیست سنجی قرار گرفتند برای این منظور از هر واحد آزمایشی ۵ عدد ماهی به صورت تصادفی و به وسیله یک تور دستی ریز چشمه صید شده و پس از بیهوشی در مخلوط ۱ گرم پودر گل میخک در لیتر آب، وزن آنها توسط ترازوی دیجیتال مدل 1300PER ADVENTURER ساخت کشور سوئیس با دقت ۰/۰۰۱ گرم و طول آنها نیز با استفاده از کولیس دیجیتال مدل Guanglu با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری می‌شد. سپس میزان فاکتورهای رشد، بر اساس فرمول های زیر محاسبه گردید(Slawski *et al.*, 2011).

وزن اولیه – وزن نهایی = رشد مطلق

طول دوره رشد/وزن اولیه – وزن نهایی= میزان رشد مطلق

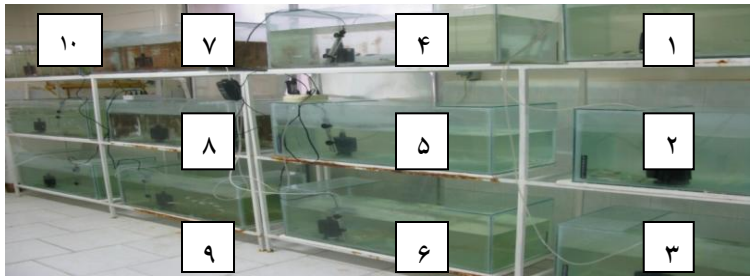
وزن افزوده شده / مقدار غذای مصرفی = FCR

$SGR = (Ln\ w1 - Ln\ w0) / T$

w_1=وزن نهایی Ln= لگاریتم نپرین

T= زمان تغذیه w_0= وزن اولیه

کنترل تلفات نیز به صورت روزانه صورت می‌گرفت. در پایان دوره آزمایش نیز پس از بیهوش‌کردن ماهیان توسط محلول عصاره گل میخک (غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر)، خونگیری به روش قطع ساقه دمی و با استفاده از لوله‌های موئینه هپارینه انجام گرفت. نمونه‌های خونی در آزمایشگاهویرومد شهر رشت از نظر پارامترهای زیر مورد بررسی قرار گرفتن(Feldman *et al.*, 2000) تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC)، هموگلوبین، هماتوکریت، لیزوزیم، IGM و لنفوسیت که همگی در واحد حجم اندازه‌گیری شدند تعیین گردید.

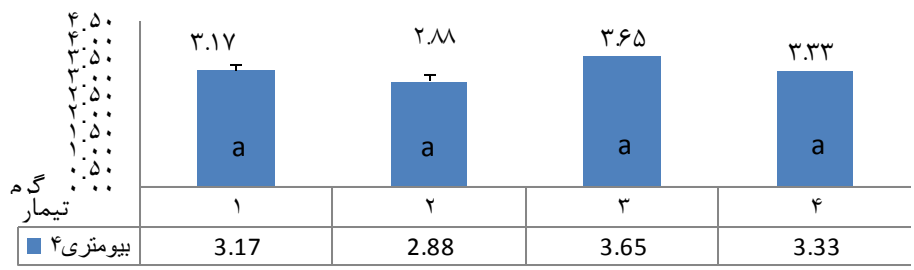


۲- نتایج

مبانگین دمای آب درطی آزمایش ^{Co} ۱۸/۱ و میانگین‌های اکسیژن محلول و pH نیز به ترتیب ۹ میلی گرم و ۷/۸ بودند(جدول ۱).در مورد شاخص وزن بچه ماهی‌ها، نتایج آنالیز واریانس داده‌ها حاکی از عدم وجود اختلافات معنی‌دار بین تیمارها بود($p>۰/۰۵$). ولی آزمون دانکن میانگین‌ها در پایان دوره آزمایش حکایت از برتری نسبی وزن بچه ماهی‌ها در تیمار ۴ (۳۰۰ میلی‌گرم مکمل میکروبی) نسبت به سایر تیمارها داشت هر چند که این برتری با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، قابل اغماض بود (شکل ۱).

جدول ۱: نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط پرورش در طول دوره آزمایش

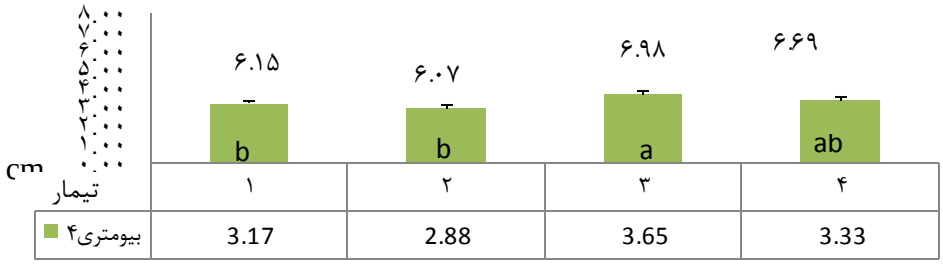
دفعات زیست سنجی	تاریخ های زمانی اندازه گیری	دمای آب (درجه سانتیگراد)	اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)	pH
۱	۹۲/۶/۱	۱۸/۴	۷/۷	۶/۸
۲	۹۲/۶/۱۵	۱۸	۸/۹	۷
۳	۹۲/۶/۲۹	۱۷/۵	۷/۳	۷/۵
۴	۹۲/۷/۱۳	۱۷/۶	۹/۱	۷/۸



شکل۲ - مقایسه میانگین وزن ماهی ها (گرم) در تیمارهای مختلف در پایان تحقیق

۲-۱- طول ماهی‌ها

تغیرات طول بچه ماهیان در انتهای دورهٔ آز مایش را می توان در شکل ۲ مشاهده نمود.

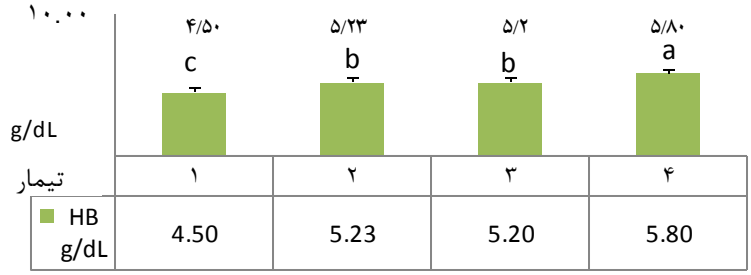


شکل ۳- مقایسه تغیرات طول بچه ماهی ها در تیمارهای مختلف در پایان تحقیق.

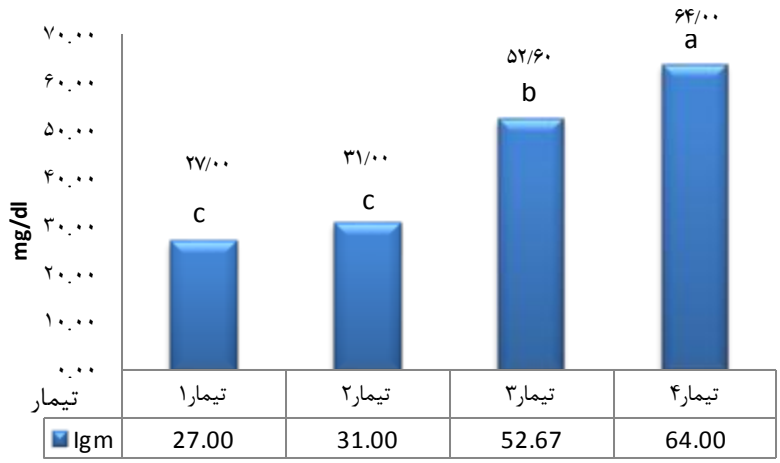
نتایج آنالیز واریانس داده های طول نیز حاکی از عدم وجود اختلافات معنی دار بین تیمارهای آزمایش بود (p>۰/۰۵). اما نتایج آزمون دانکن میانگین ها، حاکی از برتری اندک تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها بود (شکل ۲).

در مورد ضریب تبدیل غذا نیز، نتایج تجزیه واریانس داده ها حاکی از عدم وجود اختلافات معنی دار بین تیمارها در انتهای آزمایش بود (p>۰/۰۵). وضعیت مذکور در مورد نرخ رشد ویژه نیز مشاهده شد به نحوی که درپایان آزمایش، تیمارها هیچ گونه اختلاف معنی داری با هم نداشتند(p>۰/۰۵). اما نتایج آزمون دانکن حاکی از برتری نسبی تیمار ۴ با میانگین ۲/۵ نسبت به سایر تیمارها بود. میانگین نرخ رشد ویژهٔ سایر تیمارها نیز بین ۱/۵۵ – ۱/۰۲ بودند .

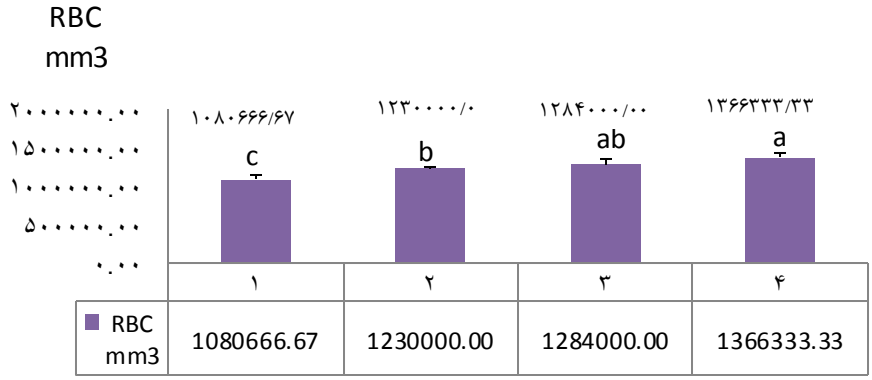
نتایج تجزیه واریانس داده های خونی تیمارهای مختلف در خصوص میزان هموگلوبین،IgM، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون بچه ماهیان در آخرین روز آزمایش حاکی از وجود اختلافات بسیار معنی دار بین آنها بود (p<۰/۰۱). به نحوی که تیمار ۴ با بیشترین میزان مصرف پروبیوتیک، بیشترین میزان هموگلوبین در خون،IgM ، تعداد گلبولهای قرمز را دارا بود (رتبه‌ی a) . این موضوع نشان می دهد که مقدار فاکتورهای فوق تحت تأثیر پروبیوتیک باکتوسل روندی افزایشی داشته است چرا که در تیمار شاهد که فاقد این مکمل غذایی بوده ، میزان فاکتورهای مذکور در کمترین سطح بودند (شکل های ۳، ۴ و ۵).



شکل ۴- مقایسه میزان هموگلوبین(گرم در دسی لیتر خون) ماهیان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش.

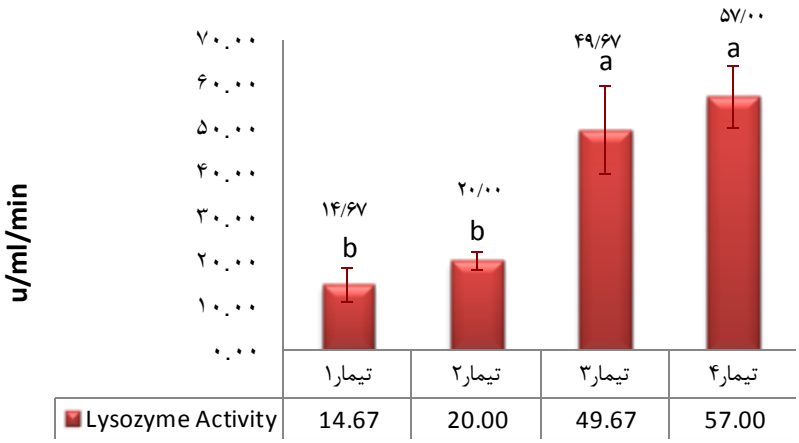


شکل ۵- مقایسه IgM خون ماهیان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش



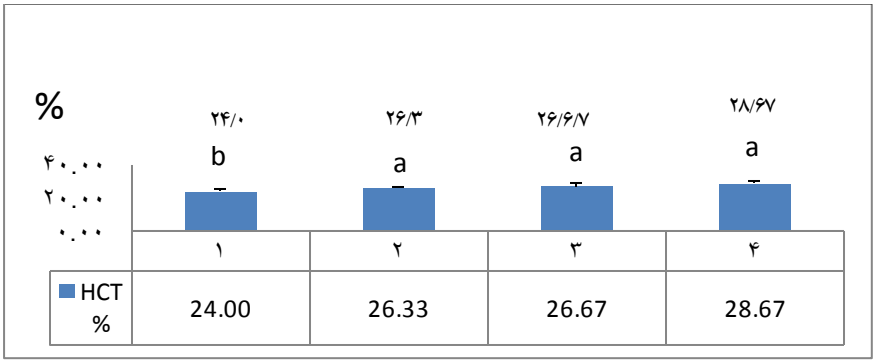
شکل ۶- مقایسه تعداد گلبول قرمز خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف در پایان آزمایش.

نتایج حاصله از آنالیز واریانس داده‌ها در مورد تعداد مونوسیت های شمارش شده نیز حاکی از عدم وجود اختلافات معنی‌دار بین تیمارها بود ($p>۰/۰۵$) و هر چهار تیمار به صورت هم سطح در یک رتبه قرار گرفتند. اما تیمار شاهد دارای کمترین میانگین بود. این موضوع در مورد تعداد لنفوسیت‌ها کاملاً برعکس بود($p<۰/۰۱$) به نحوی که تیمار شاهد واجد بیشترین تعداد لنفوسیت و تیمار ۴ که بیشترین میزان مکمل میکروبی را مصرف کرده بود واجد کمترین میزان لنفوسیت بودند.نتایج تجزیه واریانس داده‌ها و آزمون میانگین‌های دانکن در مورد تعداد لیزوزیم، وجود اختلافات بسیار معنی‌دار را در میان تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۱$). به نحوی که تیمارهای ۴ و ۳ به ترتیب در بالاترین سطح و تیمار ۲ و ۱ به ترتیب در جایگاه پایین‌تری قرار داشتند (شکل ۶).

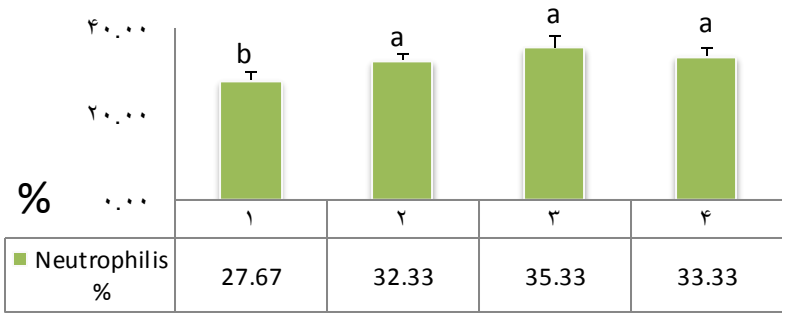


شکل ۷- مقایسه مقدار لیزوزیم خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش.

آنالیز واریانس دادهای مربوط به هماتوکریت خون نیز بیانگر وجود اختلافات معنی دار بین تیمارهای مختلف بود ($p<0.05$) و تیمار ۲ و ۳ و ۴ به طور همسطح در یک رتبه قرار داشتند ولی تیمار ۴ بیشترین مقدار هماتوکریت خون را سبب شده بود و تیمار۱ (تیمار شاهد) در پایین‌ترین رتبه قرار داشت(شکل ۷). تعداد نوتروفیل نیز در تیمارهای مختلف،از الگوی کاملاً مشابه با مقدار هماتوکریت تبعیت می-نمود($p<0.05$) (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه میزان هماتوکریت خون بچه ماهی‌ها در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش



شکل ۹- مقایسه میزان نوتروفیل فون بچه ماهی‌ها در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

۴- بحث

نتایج این تحقیق نشان داد افزودن سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم مکمل میکروبی باکتوسل به هر کیلوگرم جیره بچه‌ماهی سفید به طور معنی‌داری موجب افزایش فاکتورهای مختلف خونی، ایمنی و مقاومت نهایی بچه‌ماهی‌ها در مقایسه با گروه شاهد(تیمار بدون افزودن پروبیوتیک باکتوسل) گردید. استفاده از مکمل میکروبی باکتوسل تأثیر معنی‌داری روی فاکتورهایرشد و تغذیه بچه‌ماهی سفید ایجاد نکرد و تفاوت معنی‌داری بین فاکتورهای رشد، بقا بین تیمار شاهد با سایر تیمارها مشاهده نشد($p>۰/۰۵$) . تیمار ۳ دارای بهترین رتبه از لحاظ افزایش رشد طولی و وزنی می‌باشد.میزان فاکتورهای خونی IgM، RBC، هماتوکریت، لیزوزیم، هموگلوبین و نوتروفیل در تیمارهای مختلف از الگوی مشابهی برخوردار بودند و در تیمار چهار دارای بیشترین مقدار و در تیمار یک(تیمارشاهد) دارای کمترین مقدار می‌باشد. ایمنوگلبولین‌ها، پروتئین‌هایی هستند که خاصیت آنتی بادی داشته و در جریان خون محلول اند و به عنوان

بخشی از پروتئین‌های پلاسمای خون اندازه‌گیری می‌شوند. بطوری‌که تیمار ۲۰۰ گرم پروبیوتیک باکتوسل در هر تن از غذا در بین سه سطح پروبیوتیک مصرفی، قدرت ایمنی بالاتری حاصل نمود. بالا رفتن قدرت دفاعی بدن را در تیمارهای پروبیوتیکی می‌توانددر برخی تحقیقات دیگر نیزمشاهده نمود.

محققین دیگری نیز با افزودن انواع پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی، نتایج مشابهی بدست آوردند، به طوریکه کامگار و همکاران(۱۳۹۱) در آزمایشی، از باکتوسل به عنوان پروبیوتیک در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استفاده کردند و مشاهده نمودند که ماهیان تیمار شده، دارای میزان بیشتری از ایمنوگلوبولین و لیزوزیم نسبت به گروه شاهد بودند.

در مطالعه‌ای که توسط Panigrahi و همکاران (2005) روی سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین-کمان انجام گرفت، سطح ایمونوگلبولین کل (Ig) در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود که با تحقیق حاضر مطابقت دارد.

در این تحقیق استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره غذایی گروه تیمار باعث افزایش میزان گلبول‌های سفید، قرمزو هماتوکریت خون ماهی گردید. در مطالعه‌ای کهRengpipat و همکاران(2003) بر روی میگو انجام دادند و از *S11 Basillus* به عنوان پروبیوتیک استفاده نمودند، نتایج امیدوار کننده‌ای در مورد تحریک پاسخ ایمنی در میگوی Monodon.p گزارش کردند. در تحقیق مزبور شاخص‌های ایمنی مانند فاگوسیتوزیس و عالیت ضد باکتریایی در تیمارهای واجد پروبیوتیک، افزایش یافت.

در مطالعه‌ای که Nikoskelanen و همکاران (2003) بیان کردند که باکتری‌های پروبیوتیکی روی سیستم ایمنی اختصاصی و ذاتی ماهی تأثیرگذار بوده و در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به سایر تیمارها سطحIgM به طور چشمگیری افزایش می یافت. تحقیقات صورت گرفته حاکی از این مطلب می‌باشد که مقدارIgM با توجه به سن و اندازه ماهی، شرایط محیطی و یا وجود بیماری تغییر می‌کند. از این رو بایستی تأثیر عوامل محیطی را بر سیستم ایمنی ماهی‌ها و نتایج به دست آمده، در نظر داشت. در این تحقیق استفاده از باکتوسل در جیره غذایی گروه تیمار باعث افزایش میزان گلبول سفید، قرمز و هماتوکریت خون ماهی گردید.

در تحقیقات مشابه دیگری کهToak و همکاران (2006) در آزمایشی بر روی فلاندر ژاپنی*Paralichthys olivaceus* مشاهده کردند که طول و وزن نهایی در گروه‌هایی که از پروبیوتیک استفاده شد، بالاتر بود. در مطالعه‌ای که توسط Ghosh و همکاران(2002) از باکتری *Bacillus circulans* جدا شده از روده ماهی انگشت قد *Labeo rohitaRohu* استفاده نمودند و اثر آن را بر میزان رشد لارو ماهی Rohu بررسی کردند، رشد بهتری را در تیمارهای پروبیوتیکی بدست آوردند.

Munro و همکاران (1993) معتقد بودند که تشکیل کلونی روده معمولاً همزمان با شروع تغذیه خارجی افزایش می‌یابد و مشابه غذای زنده‌ای می‌گردد که در محیط پیرامون وجود دارد.

نکته قابل توجه حضور پروبیوتیک در روده ماهیان شاهد بوده و این موضوع به گسترش و انتشار وسیع باکتری پدیوکوکوس در محیط بستگی دارد که ممکن است در جریان اختلاط غذا با باکتری یا موقع غذا دادن و دست‌های آلوده این نفوذ صورت گرفته باشد. درتحقیق انجام‌شده، میزان کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری در گروه شاهد نسبت به گروه‌های تیماربندی بیشتر بوده و مشخص است که درگروه تیماری، باکتری های حاوی اسید لاکتیک جایگزین باکتری‌های دیگر شده و باعث کاهش میزان شمارش کلی باکتری‌ها شده است. لذا در شمارش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط MRS بیشترین میزان را در گروه تیمار۲ درصد دارا بوده و گروه شاهد میزان بسیار کمتری را داراست پس از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

ضمن اینکه با افزایش پروبیوتیک باکتوسل در غذا، میزان حضور این پروبیوتیک در روده افزایش یافت که خود تأییدی بر این واقعیت است که همزمان با افزایش سطح پروبیوتیک در غذا، نسبت این باکتری در روده تغییر می‌کند.Ringo و همکاران(1996) در آزمایشی که بر روی لارو توربوت انجام داده بودند دریافتند که میکروفلور روده در لارو توربوت قویاً تحت تأثیر*Vibrio pelagius* قرار گرفته بود و بخش زیادی از فلور روده را تشکیل داده بود.

در آزمایش Gilberg و همکاران(1995)، *Carnobacterium divergens* را به صورت فریز خشک به جیره غذایی اضافه نمودند که منجر به افزایش تعداد زیادی از این نژاد در روده آزاد ماهی اطلس شده بود. همچنین ۷۰ درصد میکروفلور روده لارو کاد را، پس از قرار گرفتن در معرض باکتری*Lactobacillus plantarum* تشکیل داده بود. در حالی که در گروه شاهد فقط یک درصد میکروفلور روده را تشکیل داده بود. ناصری نیز در سال۱۳۸۷به این نتیجه رسید که هرچه میزان پروبیوتیک افزوده شده به غذا بیشتر باشد، به همان نسبت مقدار آن در روده ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بیشتر می شود.

در نتیجه افزایش جمعیت باکتوسل در روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌تواند دال بر قدرت بالای این باکتریدر تشکیل کلونی در روده ماهی باشد. اما چون در این آزمایش پروبیوتیک دائماًاز طریق غذا وارد دستگاه گوارش شده بود، در مورد توانایی تکثیر آن در روده نمی‌توان نظر قطعی داد، از طرف دیگر با توجه به تراکم بالای آن می‌توان نتیجه گرفت که باکتوسل‌ها قدرت جای‌گیری بالایی در روده بچه ماهی کپور معمولی داشته باشند و همچنین توانایی پایداری آنها در برابر شرایط محیطی داخلی روده بسیار بالا باشد.

کامکار و همکاران(۱۳۹۱) در آزمایشی که بر روی تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انجام دادند و از *Bacillus subtilis* به عنوان پروبیوتیک استفاده کردند، در پایان دوره مشاهده نمودند که ماهیان تیمار دارای میزان بیشتری از ایمنوگلوبولین و لیزوزیم نسبت به گروه شاهد هستند. نتایج تحقیق حاضر در مجموع حاکی از آن بود که پروبیوتیک باکتوسل اثر خاصی بر فاکتورهای رشدبررسی شده نداشت ولی تأثیر کاملاً محسوس و مثبتی بر فاکتورهای خونی و ایمنی بررسی شده در بچه ماهی‌های آزمایشی داشت.

فهرست منابع

۱-**کامکار، م؛ قانع، م؛ پورغلام، ر؛ قیاسی، م،(۱۳۹۰)**، بررسی تأثیر باسیلوس سوبتیلیس(*Bacillus subtilis*) به عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) به دنبال عفونت تجربی با استرپتوکوکوس اینیه(*Streptococcusiniae*)،دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران،۱۳صفحه.

۲- ناصری، س،(۱۳۸۷)، بررسی تأثیر پروبیوتیک و آهن بر رشد و بازماندگی لارو قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchusmykiss*, Walbaum, 1792)، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۱۵۴ صفحه.

3-**Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi, and D. R. W.Griffith, 1995.**A probiotic strain of Vibrio alginolyticus effective in reducing diseases caused by *Aeromonassalmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*.Journal of Fish Disease. 18:93-96.

4-**FAO , 2012.**The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome. 209 pp.

5-**FAO , 2012.** World Agriculture Towards 2030/2050:The 2012 revision. ESA E Working Paper No. 12- 03. http://www.fao.org/economic/esa/esag/en/.

6-**Farzanfar, A, 2006.**The use of probiotics in shrimp aquaculture.FEMS Immunology and Medical Microbiology. 48:149-158.

7-**Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and jane, N.C., 2000.**Schalm Veterinary Hematology.5th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Pp. 1120-1124.

8-**Fuller, R, 1989.**Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriology. 66: 365-378.

9-**Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002.** Growth and survival of Rohu, *Labeo rohita*(Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. Acta.Icthology Piscatorial. 32(1): 83-92.

10-**Gildberg, A., Johansen, A., Bogwald, J., 1995.** Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with Aeromonassalmonicida. Aquaculture. 138: 23-34.

11- **Munro, P.D., Birkbeck, T.H., Barbour, A., 1993.** Bacterial flora of rotifers (*Brachionus plicatilis*): Evidence for a major location on the external surface and methods for reducing the rotifer bacterial load. In Fish Farming Technology - Proceedings of the First International Conference of on Fish Farming Technology.Reinerstein,H., Dahle,L.A., Jogensen,L., and Tvinnereim,K. (eds.). A.A. Balkema, Rotterdam. Pp: 93-99.

12-**Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003.**Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*).Fish & Shellfish Immunology. 15(5): 443-452.

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

14-**Rengpipat, S., Tunyamum, A., Fast, A.W., Piyatiratitivoraku, S., Menasveta, P., 2003.** Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *penaeus monodon* fed a Bacillus probiotic. Diseases of Aquatic organisms. 55: 169-173.

15-**Ringo, E., Vadstein, O., 1998.** Colonization of Vibrio pelagius and AeromonascaĺIae in early developing turbot_*Scophthalmus maximus* L. larvae.Journal of Applied Microbiology. 84: 227–233.

16-**Slawski H, Adem H, Tressel R-P, Wysujack K, koops U, Wuertz S, Schulz C, 2011.** Total fish meal replacement with rapeseed protein concentrate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*Walbaum). Aquacultint.Dol 10.1007/s10499-011-9476-2.

17-**Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K., Koshio, S., 2006.**Growth,Stress tolerance and non-specific immune response of

Japanese flounder Paralichthysoliraceus to probiotics in a closed recirculating system. Fisheries Science. 72(2): 310-321.