فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۸، جلد ۱۳، شماره ۱۴، زمستان ۹۸، صفحه۸۵ تا ۹۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی اثر پروبیوتیک کلوستات(*Bacillussubtilis*) بر روی برخی از شاخص‌های رشد، خونی و بافت روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchusmykiss*)

مهرزاد محمدی[۱]، **سجاد پورمظفر**[۲]، محسن گذری[۲]
۱- دانشکده شیلات، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران.
۲-ایستگاه تحقیقاتی نرمتنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بندر لنگه، ایران. **Sajjad5550@gmail.com**

تاریخ دریافت:۹۸/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱

چکیده

زمینه و هدف: امروزه در صنعت آبزی پروری، استفاده از پروبیوتیک‌هابه عنوان جایگزین مناسب آنتی بیوتیک‌هاافزایش چشمگیری داشته است.این مطالعه به بررسی اثر رژیم خوراکی حاوی پروبیوتیک تجاری*B. subtilis*(KEMIN®)بر شاخص‌های رشد، خونی و مورفولوژی بافت روده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchos mykiss*) پرداخته است.

روش کار: در این مطالعه تعداد ۱۳۵ عدد ماهی با وزن ۲/۵±۳۵/۶۸ گرم با رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک باسیلوس به مدت ۵۰ روز تغذیه شدند. تیمارها شامل سه جیره آزمایشی حاوی گروه شاهد(بدون پروبیوتیک)، ۱ و ۲ درصد پروبیوتیک بود. در پایان دوره از ماهی ها به صورت تصادفی نمونه برداری شد. به منظور بررسی شاخص‌های خونی(تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید)خون گیری از سیاهرگ دمی انجام و طول و عرض پرزهای روده، اندازه و تراکم سلول‌های جامی شکل در بررسی بافت شناسی اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین شاخص‌های رشد نیز مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: در پایان دوره تغذیه، عملکرد رشد نسبت در تیمارهای پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت($p<۰/۰۵$). به‌علاوه، در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک تعداد گلبول‌های قرمز، نوتروفیل و ارتفاع برآمدگی روده افزایش معنی‌داریدر مقایسه با تیمار شاهد داشت($p <۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در برخی شاخص‌های خونی(تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، نوتروفیل و مونوسیت) و مورفولوژی روده(عرض برآمدگی روده، اندازه و تراکم سلول‌های جامی شکل) مشاهده نشد($p >۰/۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده خوراکی از پروبیوتیک *B. subtilis* اثرات سودمند و مثبت بر پارامترهای رشد، خونی و هم‌چنین بافت روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت.

واژه های کلیدی: *B. subtilis*، رشد، پارامترهای خونی، بافت روده، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

مقدمه

امروزه استفاده از روش‌های فوق متراکم در صنعت آبزی‌پروری از رشد چشم‌گیری برخوردار بوده است، اما این شیوه پرورش موجب بروز بیماری‌ها و آلودگی‌ها شد، که خسارات جبران‌ناپذیری را به این صنعت وارد کرد. معمولاً برای جلوگیری و درمان این بیماری‌ها از طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت گسترده استفاده شد، ولی به دلیل اثرات منفی بر محیط‌زیست، میزبان و انسان استفاده از آن روز به روز محدود و حتی در برخی از کشورها ممنوع اعلام شد. در جانور میزبان، آنتی‌بیوتیک موجب از بین بردن فلور سودمند میکروبی در روده، کاهش رشد و بروز مقاومت باکتریایی شدند(۱۵). بنابراین علاقه‌مندی شدیدی در جایگزینی از این مواد و استفاده از روش‌های دوستدار محیط‌زیست به وجود آمد. یکی از این روش‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها

بود، که در متعادل کردن فلور میکروبی میزبان نقش مهم و تأثیرگذاری را ایفا کردند. پروبیوتیک‌ها بایستی توانایی استقرار و تکثیر در روده میزبان را داشته باشند، در غیر این صورت اثرات منفی و نامطلوبی را بر جای خواهد گذاشت(۲۳). مکانیسم اثر پروبیوتیک‌های استفاده شده در آبزی‌پروری عبارت‌اند از: جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا با تولید مواد مهارکننده، بهبود کیفیت آب، بهبود سیستم ایمنی میزبان، افزایش جذب مواد غذایی و ترشح آنزیم‌های گوارشی(۳۱). پروبیوتیک باسیلوس سابستیلیس(*B.subtilis*) یک باکتری ساپروفیت گرم مثبت، غیر بیماری‌زا و اسپور آن در آب، هوا، خاک و رسوبات یافت می‌شود(۲۶). هم‌چنین آن‌ها قادر به تحمل شرایط ناپایدار هم‌چون دماهای بالا و قرار گرفتن در شرایط خشکی می‌باشند(۲۶). این باکتری اثرات مثبتی بر رشد، جذب مواد غذایی(۲۴)، کیفیت آب و بقاء در مواجهه با گونه‌های بیماری‌زا(۹) در ماهیان و سخت‌پوستان داشته است. هم‌چنین باسیلوس به آنتی‌بیوتیک‌ها در نفوذ به لایه چسبناک اطراف باکتری‌های گرم منفی کمک می‌کند. بهبود پارامترهای رشد در پاسخ به رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک باسیلوس در ماهی تیلاپیا(*Yoshitomi tilapia*)(۲۴). تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*)(۱۹)، میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*)(۲۹)، میگوی بزرگ آب شیرین(*Macrobrachium rosenbergii*)(۱۹) و قزل‌آلای رنگین‌کمان(۲۱) گزارش شده است. لوله گوارشی در مهره‌داران عموماً وظیفه هضم، گوارش و جذب مواد غذایی را بر عهده داشته و انواع مختلفی از باکتری‌ها با تراکم‌های مختلف در این قسمت حضور دارند که در متابولیسم میزبان اثرگذار می‌باشد. در پرورش آبزیان بالا بردن عملکرد سیستم گوارشی و مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا، از اهمیت زیادی برخوردار است. روده در ماهیان بافت پوششی ساده‌ای دارد که در بین آن سلول‌های جامی شکل مسئول ترشح موکوس حضور دارند(۲۰). موکوس تولیدی به وسیله سلول‌های جامی شکل از کاهش آب و لیز شدن مجاری روده‌ای جلوگیری می‌کند و روده را از آسیب‌های فیزیکی و عوامل مضر مصون می‌دارد(۱۸). از این رو، مطالعه آن به عنوان مانع فیزیکی و هم‌چنین درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی از اهمیت دو چندانی برخوردار می‌باشد. هم چنین، این بخش به همراه پوست و آبشش به عنوان یکی از راه‌های اصلی نفوذ عوامل بیماری‌زا در موجودات آبزی شناخته می‌شود. بر همین اساس، استخراج باسیلوس سابستیلیس از روده ماهی آمور (*Ctenopharyn godonidella*) و استفاده آن در رژیم غذایی موجب کاهش تعداد کلونی‌های باکتری *Aeromonas hydrophila* و آسیب بافتی به روده پس از مواجهه شد. هم‌چنین باکتری باسیلوس سابتیلیس نقش مهمی در حفظ یک‌پارچگی و انسجام برآمدگی‌های روده‌ای داشت(۸). به علاوه، مطالعات پیشین نشان داده است که استفاده خوراکی از سطوح مختلف باسیلوس سابستیلیس به مدت ۶۰ و ۲۸ روز منجر به بهبود عملکرد روده به ترتیب در تیلاپیای نیل(۲۰) و ماهی شانک(*Sparus aurata*) می‌شود(۲). بافت و اجزای لوله‌ی گوارشی هم‌چون سلول‌های جامی شکل(سلول‌های ترشح‌کننده موکوس)، معمولاً به تغییر در رژیم غذایی حساس می‌باشند. Ramos و همکاران (۲۰۱۷)(۱۸)، و Fernandes و همکاران(۲۰۱۵)(۴) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) منجر به تغییر تعداد سلول‌های جامی شکل، عملکرد جذب و گوارش مواد غذایی خواهد شد. در مطالعه دیگر، تجویز خوراکی باکتری باسیلوس سابتیلیس به میزان 10^5 و 10^8 کلونی در هر کیلوگرم موجب بهبود ترشح آنزیم‌های هضمی و شاخص های رشد هم‌چون افزایش وزن ثانویه و ضریب

رشد در میگوی وانامی شد(۷). خالقی و همکاران(۱۳۹۷)، بیان کردند که مخلوط تجاری حاوی سویه های باسیلوسی نقش مهمی در افزایش وزن و بهبود شاخص‌های رشدی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)دارد(۱).علاوه بر این، تخمیر سویا به وسیله ی باکتری باسیلوس واستفاده آن در جیره‌ی غذایی خوک، اثر سودمند و مفیدی در بهبود رشد از طریق کاهش التهاب غذایی داشت(۳۰). حتی مواد استحصالی از این باکتری نقش مهمی در بهبود شاخص های فیزیولوژیکی آبزیان نقش داشته است. به عنوان مثال، شاخص های ایمنی و هم‌چنین عملکرد رشد ماهی *Yoshitomi tilapia* پس از تغذیه با ماده استخراجی از باکتری باسیلوس سابتیلیس(1-Deoxynojirimycin)افزایش یافت(۲۰). با توجه به مطالب عنوان شده در فوق، هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی پتانسیل پروبیوتیک تجاری حاوی باکتری باسیلوس سابستیلیس بر عملکرد رشد، شاخص‌های خونی و بافت‌شناسی روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تأمین ماهی

۱۳۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان(*Oncorhynchu mykiss*) به ظاهر سالم با وزن تقریبی ۲/۵۰ ± ۳۵/۶۸ گرم از مزارع تکثیر و پرورش است از فارس خریداری و در تانک‌های مخصوص حمل ماهی با تزریق اکسیژن خالص به محل اجرای پروژه انتقال داده شد. بعد از انتقال و انجام عمل هم دمایی، برای جلوگیری از وارد آمدن استرس به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند. ماهیان در آکواریوم‌های ۶۴ لیتری(با ابعاد ۴۰ × ۴۰ سانتی‌متر طول و عرض و ارتفاع آبگیری ۴۰ سانتی‌متر) نگهداری شدند. به طوری که۱۳۵ عدد ماهی در۹ آکواریوم و هرآکواریوم ۱۵ عدد ماهی بعد از زیست سنجی اولیه نگهداری شد. چیدمان آکواریوم‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند تا تیمارها و تکرارهای مختلف در شرایط یکسان محیط آزمایشگاهی قرار گیرند. طول دوره پرورش ۵۰ روز در نظر گرفته شد. عوامل فیزیکی آب شامل درجه حرارت(۰/۲ ± ۱۶ درجه سانتی گراد)، اکسیژن محلول(۷-۹ میلی‌گرم در لیتر)، pH(۸/۱۵-۷/۲۵میلی‌گرم در لیتر)، و شوری(۲/۵- ۲/۷۴ گرم در لیتر) همه روزه به وسیله دستگاه‌های دیجیتال قابل حمل WTW با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد.

غذادهی

جیره غذایی به صورت اکسترودر با علامت اختصاری(EX-TG1) از شرکت تعاونی ۲۱ بیضاء خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. متوسط ترکیبات غذایی، پروتئین خام ۴۵٪، چربی خام ۱۴٪، فیبر خام ۲٪، رطوبت ۱۰٪ و قطر خوراک ۲/۴ میلی‌متر بود. میزان غذادهی به ماهیان ۱/۵ درصد وزن توده زنده بودکه در دو نوبت صبح و بعد از ظهر به ماهیان خورانده شد. میزان غذادهی براساس جداول غذادهی توصیه شده توسط شرکت سازنده خوراک ماهی تعیین گردید. پروبیوتیک استفاده شده در این پژوهش با نام تجاری کلوستات(KEMIN®) حاوی باکتری باسیلوس سابستیلیس بود که به روش خوراکی به ماهی خورانده شد. کلوستات حاوی باسیلوس سابستیلیس به میزان10^{7}cfu/g× ۲/۲، کربنات کلسیم، روغن سویا و مالتو دکسترین بود. جهت جلوگیری از پرت شدن غذا، غذادهی زمانی که ماهی‌ها حرکات فعال تغذیه‌ای نشان می‌دادند، انجام می گردید. روزانه ۵۰٪ درصد از آب آکواریوم‌ها جهت جلوگیری از کمبود اکسیژن تعویض شد. جهت تهیه پلت حاوی پروبیوتیک از روش(۲۷) استفاده گردید، بدین ترتیب که ۱ و ۲ گرم کلوستات به ازای هر ۱۰۰ گرم غذا، با روغن ماهی(۳۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم غذا) مخلوط و سپس سوسپانسیون کلوستات و روغن بر روی غذا اسپری شد. مقادیر پروبیوتیک

استفاده شده در این پژوهش براساس مطالعه انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت(۱۱، ۳).

رشد

وزن هر ماهی در انتهای دوره آزمایش با استفاده از ترازوی دیجیتال AND مدل C0006 با دقت ۰/۰۱ گرم ساخت کشور ژاپن مورد اندازه‌گیری شد. افزایش وزن، رشد روزانه، ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی از جمله مهم‌ترین فاکتورهایی بودند که مورد بررسی قرار گرفت.

وزن اولیه – وزن نهایی = افزایش وزن

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

تعداد روزهای پرورش / افزایش وزن متوسط ماهی‌ها= میزان رشد یا افزایش وزن روزانه

طول دوره پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن ثانویه) × ۱۰۰ = ضریب رشد ویژه افزایش وزن توده زنده / مقدار غذای مصرفی = ضریب تبدیل غذایی

خون‌گیری

نمونه‌گیری از خون ماهیان بی‌هوش شده(ازهرتکرار۳عدد) با عصاره گل میخک(۱۷۰ میلی گرم در لیتر) بعداز زیست‌سنجی با فرو بردن سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین در سیاهرگ دمی و ۵۰روز بعداز شروع آزمایش انجام پذیرفت. شمارش گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز با استفاده از محلول دایسیس(Dacies fluid) با رقیق کردن خون با غلظت ۵۰:۱ از طریق لام هموسیتومتر انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با تهیه گسترش خونی و با استفاده از گیمسا ۵ درصد(ARJ:1013) به مدت ۴۵ دقیقه انجام گردید. هماتوکریت به روش میکروسانتریفیوژ و با استفاده از لوله‌های میکرو هماتوکریت هپارینه اندازه گیری شد. هم‌چنین میزان هموگلوبین خون نیز با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین مورد سنجش قرار گرفت(۲۵).

نمونه‌برداری از روده

به منظور بررسی تغییرات احتمالی مورفولوژیک روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره پرورش ۶ عدد ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب و نمونه بافت روده از محل یکسانی برداشته شد. ابتدا نمونه‌ها در محلول ۱۰ درصد فرمالین برای ۳ روز فیکس، سپس برای نگهداری بیشتر وارد محلول اتانول ۷۰ درصد تا زمان بررسی شدند. برش عرضی(۵-۷ میکرون) با استفاده از میکروتوم تهیه و سپس نمونه‌ها با ائوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردیدند(۱۷). به منظور بررسی طول(ارتفاع) و عرض چین‌خوردگی روده(میکرومتر)، تراکم(تعداد در هر میلی‌متر مربع) و اندازه سلول‌های جامی شکل(میکرومتر مربع)، ۸ تصویر از هر نمونه تهیه شد(شکل ۱). از نرم‌افزار(Digimizer(Version 4.1.1.1، برای تخمین و اندازه‌گیری شاخص های فوق استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

پراکنش نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف - اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار تعیین شد و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از تست LSD در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد(۱۶).

نتایج

نتایج حاصل از زیست‌سنجی ماهیان در پایان دوره آزمایش در جدول ۱ نشان داد که پروبیوتیک باسیلوس قادر به ارتقاء شاخص‌های رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. بر همین اساس بالاترین میزان وزن ثانویه در تیمارهای ۱(۶۲/۱۴±۳/۳۵) و ۲ درصد

باسیلوس(۱/۳۵±۶۳/۹۰) به ثبت رسید که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت(p <۰/۰۵). افزایش معنی‌داری در مقدار ضریب رشد ویژه در تیمار ۱ و ۲ درصد کلوستات(به ترتیب ۱/۱۱±۱/۱۵ و ۰/۰۴±۱/۱۷) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد(p <۰/۰۵). میزان رشد روزانه در تیمارهای حاوی پروبیوتیک حدود ۵۷/۵۴-۰/۰ گرم بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت(p <۰/۰۵). افزایش وزن و درصد افزایش وزن در تیمار ۲ درصد در مقایسه با سایر تیمارها افزایش داشت و این اختلاف با تیمار ۱ درصد معنادار نبود(p >۰/۰۵)، اما هر دوی آن‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند(p <۰/۰۵). در تیمارهای تحت تأثیر کلوستات، ضریب تبدیل غذایی بین ۱/۲۶-۱/۳۰ بود که کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (p <۰/۰۵).

فاکتورهای خونی: بالاترین میزان گلبول قرمز در تیمار کلوستات ۲درصد(۶۸/۷۵ ۲۵/۱۰۸۱±) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (۷۵/۷۱±۹۵۹/۱۹) داشت(p<۰/۰۵). تعداد گویچه‌های سفید از ۱۲/۹۰(هزار عدد در هر میلی‌متر مکعب) در تیمار شاهد به حدود ۱۴/۰۷ تا ۱۴/۳۰(هزار عدد در هر میلی‌متر مکعب) در تیمارهای حاوی کلوستات رسید که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد(p >۰/۰۵). درصد لنفوسیت موجود در خون در تیمارهای آزمایشی روند کاهشی را نشان داد به طوری که از ۸۵ درصد در تیمار شاهد به ۶۸ درصد در تیمار ۲ درصد کلوستات کاهش یافت و این اختلاف معنی‌دار بود(p<۰/۰۵). در حالی که درصد نوتروفیل در تیمار ۲ درصد کلوستات افزایش حدود ۱۲۷ درصدی نسبت به تیمار شاهد و ۷۸ درصدی نسبت به تیمار ۱ درصد داشت(p<۰/۰۵). به علاوه، تفاوت معنی‌داری در درصد مونوسیت، هماتوکریت و هموگلوبین میان تیمارهای مختلف مشاهده نشد(p>۰/۰۵).

بافت داخلی روده: برخی مشخصه‌های مورفومتریک بافت روده هم‌چون ارتفاع و عرض پرزها و هم‌چنین تراکم و اندازه سلول‌های جامی شکل در جدول ۳ نمایش داده شده است. بیشترین ارتفاع به ترتیب در تیمار ۱ درصد(۲۳/۶۹±۴۰۱/۹ میکرومتر) و ۲ درصد کلوستات(۰۲/۳۵±۳۶۱/۱۴ میکرومتر) به ثبت رسید که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت(p<۰/۰۵). با وجود افزایش عرض چین خوردگی‌ها(میکرومتر) در تیمارهای آزمایشی، اما تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد به‌طوری که اندازه این شاخص بین ۶۱/۲۰±۵۸/۳ میکرومتر در تیمار شاهد و ۲/۸۳±۶۱/۰۹ میکرومتر در تیمار ۲ درصد پروبیوتیک متغیر بود(p>۰/۰۵). افزایش اندکی در تعداد سلول‌های جامی شکل در هر میلی‌متر مربع در تیمارهای حاوی کلوستات مشاهده شد، اما تفاوتی از لحاظ آماری در تیمارها به ثبت نرسید(p>۰/۰۵). اندازه سلول‌های جامی شکل در تیمارهای ۱ و ۲ درصد کلوستات به ترتیب برابر با ۱۴±۲۲۳/۲۳ و ۱۷/۹۴±۲۱۸ میکرومتر مربع بود که در مقایسه با تیمار شاهد ۱۸/۷۷±۲۴۷/۱۱ اختلاف آماری به ثبت نرسید(p>۰/۰۵).

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کلوستات در طی یک دوره ۵۰ روزه.

(اطلاعات بر مبنای میانگین±انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نشان دهند تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).

	تیمار		
شاخص‌های رشد	تیمار شاهد	۱ ٪ کلوستات	۲ ٪ کلوستات
وزن اولیه(gr)	۵۰/۷۰ ±۰/۳۴ a	۰±۳۵/۴۲a	۳۵/۰۵۸/۵۶a
وزن نهایی(gr)	۵۶/۰±۷۵/۶۶b	۶۲/۳±۱۴/۳۵a	۶۳/۱±۹۰/۳۵a
ضریب رشد ویژه	۰/۰±۹۸/۰۱b	۱/۰±۱۵/۱۱a	۱/۰±۱۷/۰۴a
میزان رشد روزانه(gr)	۰/۰±۴۴/۰۱b	۰/۰±۵۴/۰۷a	۰/۰±۵۷/۰۲a
افزایش وزن (gr)	۲۲/۰±۰۵/۳۳b	۲۷/۳±۱۴/۳۰a	۲۸/۱±۳۱/۱۹a
درصد افزایش وزن بدن(٪)	۶۳/۱±۵۴/۱۸b	۷۷/۹±۵۴/۳۷a	۷۹/۳±۵۸/۵۰a
ضریب تبدیل غذایی	۱/۰±۵۷/۰۳a	۱/۰±۳۰/۱۷b	۱/۰±۲۶/۰۶b

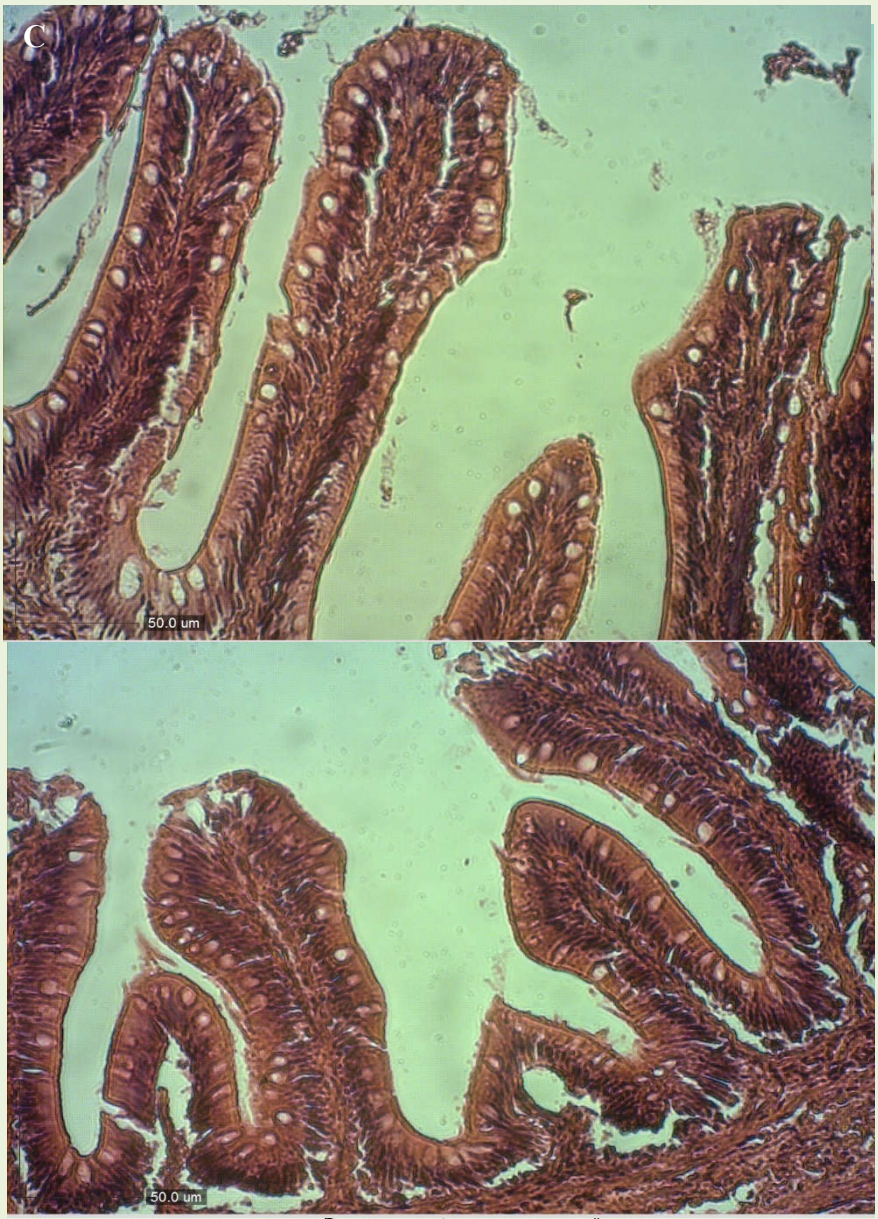
جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های خونی در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کلوستات در طی یک دوره ۵۰ روزه.

(اطلاعات بر مبنای میانگین±انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است).

	تیمار		
شاخص‌های خونی	تیمار شاهد	۱ ٪ کلوستات	۲ ٪ کلوستات
گویچه قرمز ×($۱۰^۳$) عدد در هر میلی‌لیتر مکعب	۹۵۹/۱۹±۷۵/۷۱b	۹۶۶/۲۵±۳۳/۷۹ab	±۲۵/۱۰۸۱ ۶۸/۷۵a
گویچه سفید × ($۱۰^۳$) عدد در هر میلی‌لیتر مکعب	۱۲/۱±۹۰/۸۵	۱۴/۱±۳۰/۴۱	۱۴/۱±۰۷/۵۲
درصد لنفوسیت	۳±۸۵/۴۶a	۱±۸۰ ab	۱۰±۶۸/۵۸b
درصد نوتروفیل	۱۲/۳±۳۳/۲۱b	۱۵/۱±۶۷/۵۳b	۹±۲۸/۱۷a
درصد مونوسیت	۲/۰±۳۳/۵۸	۱±۳	۳/۱±۳۳/۵۳
هماتوکریت (٪)	۳۴/۰±۸۳/۵۵	۳۳/۰±۵۲/۹۹	۳۳/۰±۹۴/۷۴
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۷/۰±۱/۸۷	۶/۰±۶۳/۵۴	۶/۰±۸۰/۶۱

جدول ۳- مشخصه های مورفومتریک بافت روده ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس

شاخص های روده ای	تیمار شاهد	۱ ٪ کلوستات	۲ ٪ کلوستات
	تیمار		
ارتفاع پرزهای روده (میکرومتر)	۲۹۵/۱۱±۱۶/۴۴^{c}	۴۰۱/۹±۲۳/۶۹^{a}	۳۶۱/۱۴±۰۲/۳۵^{b}
عرض پرزهای روده (میکرومتر)	۵۸/۳±۶۱/۲۰	۵۹/۱±۷۴/۰۹	۶۱/۲±۰۹/۸۳
تعداد سلول‌های جامی شکل (در هر میکرومتر مربع)	۳/۰±۲۹/۲	±۵۳/۳/۲۵	۳/۰±۹۵/۱۹
اندازه سلول‌های جامی شکل (در هر میکرومتر مربع)	۲۴۷/۱۸±۱۱/۷۷	۱۴±۲۲۳/۲۳	۱۷±۲۱۸/۹۴



شکل ۱- مقطع عرضی از روده ماهی قزل الای رنگین کمان رنگ آمیزی شده با استفاده از ائوزین- هماتوکسیلین.

طول (ارتفاع) (فلش دو طرفه سیاه)، عرض چین خوردگی ها (فلش دو طرفه زرد رنگ) و سلول های جامی شکل (فلش سیاه). بزرگنمایی ۱۴۰۰×. A: تیمار شاهد، B: تیمار ۱ ٪ و C: تیمار ۲ ٪ کلوستات

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک کلوستات حاوی سویه باکتریایی باسیلوس سابستیلیس موجب بهبود پارامترهای رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد، که با نتایج حاصل از مطالعات پیشین مطابقت و هم‌خوانی دارد. به عنوان مثال، رژیم غذایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک *B.subtilis* و *B. licheniformis*(۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) منجر به بهبود عملکرد رشد در ماهی کپور معمولی شد(۱). هم‌چنین افزایش مقدار*B.subtilis*به میزان(cfu/g) $۴/۲۳\times۱۰^{۱۰}$ در خوراک ماهی تیلاپیا(*Yoshitomi tilapia*) افزایش رشد و ضریب رشد ویژه را پس از ۵۶ روز به دنبال داشت(۲۴). Sun و همکاران گزارش دادند که استفاده خوراکی از باسیلوس‌ها به مدت ۶۰ روز و به مقدار(cfu/g)۱×۱۰^{۸} منجر به افزایش ۷-۵ درصدی ضریب تبدیل غذایی در ماهیان انگشت قد هامور معمولی(*Epinephelu scoioides*) شد(۲۳). به علاوه، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، استفاده خوراکی از مخلوطی از پنج گونه باسیلوس (۱×۱۰^{۶}، ۱×۱۰^{۷} و ۱×۱۰^{۸} در هر ۱۰۰ گرم غذا) به مدت ۶۰ روز افزایش شاخص‌های رشد و بهبود کارایی پروتئین و چربی را به دنبال داشت(۲۱). Hussein و همکاران، از پروبیوتیک تجاری با نام Biogen® دارای باکتری باسیلوس به همراه آنزیم‌های هضمی(آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) و پرولیتیکی به مدت ۱۸۳ روز استفاده کردند و نتایج حاصل نشان داد که وزن نهایی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) از ۲۰ گرم به ۹۱۹ گرم و ضریب رشد ویژه از ۳/۴۷ به ۳/۷۳ ارتقاء یافت(۷). اثر مثبت باسیلوس ها تنها محدود به ماهیان نمی شود به طوری که در میگوی سفید هندی(*Fenneropenaeus indicus*) موجب افزایش حدود ۲۳-۸ درصد وزن ثانویه(۳۱) و در میگوی وانامی (*Litopenaeusvannamei*) پس از ۵۶ روز تغذیه، بهبود پارامترهای رشد رابه دنبال داشت(۲۹،۳۲). رژیم حاوی پروبیوتیک ها معمولاً با افزایش هضم و جذب غذا از طریق ترشح آنزیم‌های خارج سلولی، تعادل در فلور میکروبی روده و هم‌چنین افزایش تجزیه مواد آلی موجب بهبود عملکرد رشد در آبزیان می‌شوند. باسیلوس‌ها عمدتاً با بهبود آنزیم‌های هضمی از جمله لیپاز، آمیلاز و پروتئاز و هم‌چنین سنتز اسیدهای چرب و ویتامین‌ها در روده موجب افزایش هضم غذا و افزایش رشد در ماهیان می‌شوند(۱۳). مطابق با این نتایج، Yanbo و Zirong گزارش کردند که استفاده از باسیلوس پروبیوتیکی لیوفلیزه(*Bacillus*sp) و باکتری‌های فتوسنتز کننده(*Photosynthetic bacteria*) و مخلوط آن‌ها در تغذیه نوزاد ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در تیمارهای آزمایشی را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد و ضریب تبدیل غذایی از ۲/۴۶ به ۲/۱۱ درصد کاهش یافت(۲۸). براساس نتایج این مطالعه افزایش معنی‌داری در تعداد گویچه‌های قرمز تیمارهای حاوی پروبیوتیک مشاهده شد، هر چند که این اختلاف تنها در تیمار ۲ درصد کلوستات معنی‌دار بود. از طرفی افزایش اندک در تعداد گلبول‌های سفید تیمارهای حاوی کلوستات به ثبت رسید، اما فاقد اختلاف معنادار بود. بر همین اساسFirouzbakhsh و همکاران، بیان داشتند که استفاده خوراکی از پروبیوتیک پروتکسین، باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید وقرمز در ماهی اسکار(*Astronotus ocellatus*) می‌شود(۵). هم‌چنین استفاده خوراکی از پروبیوتیک تجاری با نام دی پرو آکوا به مدت ۶۰ روز موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد نوتروفیل‌های خون ماهی کپور معمولی شد(۱). در مطالعه دیگر، افزایش اندکی در تعداد گلبول‌های قرمز تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*)

پس از تغذیه با پروبیوتیک*B.amyloliquefaciens* به میزان(cfu/g^{-1}) ۵×۱۰^{۶} مشاهده شد، اما اختلاف میان تیمارها معنی‌دار نبود. هم‌چنین، افزایش تعداد گلبول‌های سفید و قرمز را در ماهی تیلاپیای نیل پس از تغذیه با پروبیوتیک *B. amyloliquefaciens* مشاهده شد(۲۰). به نظر می‌رسد که افزایش گلبول‌های قرمز مبین این موضوع است که متابولیسم بالا و افزایش اکسیژن مورد نیاز برای متابولیسم غذا، منجر به افزایش گلبول‌های قرمز خون در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آغشته به پروبیوتیک‌ها شده و در نهایت از این طریق اکسیژن مورد نیاز بافت‌ها تأمین می‌شود(۴). به علاوه، اندازه‌گیری شاخص‌های خونی هم‌چون گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین می‌تواند در تشخیص میزان سلامتی، بیماری و یا حتی استرس مهم و تأثیرگذار باشد. رژیم غذایی حاوی مخلوط تجاری *Lactobacillus plantarum* و *B.subtilis* به میزان(cfu/g^{-1}) ۱×۱۰^{۷} به مدت ۶۰ روز تأثیری بر تعداد گلبول‌های سفید، میزان هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت(۲۲). افزایش تعداد نوتروفیل‌ها در این مطالعه می‌توان به عنوان یک تقویت‌کننده غیراختصاصی در سیستم ایمنی و افزایش توانایی بیگانه‌خواری ناشی از مصرف پروبیوتیک دانست(۶). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز خوراکی پروبیوتیک کلوستات به میزان ۱ درصد باعث افزایش ارتفاع پرزهای روده نسبت به تیمار شاهد شد. هر چند که تراکم سلول‌های جامی شکل در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کلوستات افزایش داشت، اما این افزایش معنی‌دار نبود. به علاوه، در سایر پارامترهای مورد بررسی هیچ اختلاف معنی‌داری در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کلوستات نسبت به گروه تیمار مشاهده نشد. Fernandes و Reda گزارش دادند که استفاده از پروبیوتیک *B. amyloliquefaciens* در غذای ماهی تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع روده و تراکم سلول‌های جامی شکل شد(۴،۲۰). به‌علاوه غذای غنی شده با اینولین به میزان ۱۰ گرم در هر کیلوگرم غذا موجب افزایش اندک تعداد سلول‌های جامی شکل در ماهی شانک شد(۲). افزایش ارتفاع برآمدگی‌های روده می‌تواند ناشی از تکثیر و پراکندگی پروبیوتیک در روده باشد، بهبود این عامل مزیتی برای افزایش سطح جذب و دسترسی به مواد غذایی می‌باشد که متعاقباً افزایش رشد را به دنبال خواهد داشت(۲۰). هم‌چنین مشابه با این نتایج در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از ۵ هفته تغذیه با *Pediococcus acidilactici*(۱۰) و ماهی تیلاپیای نیل بعد از ۳۰ روز تغذیه با *Lactobacillus rhamnosus*(۱۴) مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر به بررسی اثر خوراکی پروبیوتیک حاوی *B. subtilis* و *B. toyoi* به میزان ۴ گرم در هر کیلوگرم غذا در بافت روده ماهی تیلاپیای نیل پرداخته شد، نتایج حاصل نشان داد که با گذشت ۶۰ روز، افزایش معنی‌داری در ضخامت بافت روده مشاهده و به ثبت رسید(۱۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک تجاری حاوی *B. subtilis* در بهبود شاخص‌های رشد، تعداد گویچه‌های قرمز، درصد نوتروفیل و طول برآمدگی روده نقش مثبت و تأثیرگذاری را داشت. هر چند که در سایر شاخص‌ها، عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد. به‌هرحال، مطالعات تکمیلی در خصوص سنجش عوامل درگیر در سیستم ایمنی و همچنینارزش غذایی آبزیان پس از استفاده از این نوع پروبیوتیک بایستی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

۱-خالقی،م.، سلطانی،م.، حسینی شکرابی،س.پ. ۱۳۹۷ اثر افزودن مخلوط پروبیوتیک*Bucillus subtilis* و *Bacillus licheniformic*(دی پرو آکوا) به جیره غذایی بر برخی شاخص های رشد، خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی

(*Cyprinus carpio*).مجله علمی- پژوهشی زیست شناسی دریا. سال دهم. شماره سی هفت. ص ۱۱-۲۰.

2.Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M., Esteban, M. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus* subtilis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. Fish Shellfish Immunol, 34; 1063–1070.

3.El-Haroun, E.R., Goda, A.M., Kabir, A.S., Chowdhury, M.A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquac. Res, 37; 1473–1480.

4.Fernandes, T., Silva, A., Petrillo, T.R., Yunis-Aguinaga, J., Fernandes Marcusso, P., Da,G., Claudiano, S. (2015). Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. Lat. Am. J. Aquat. Res, 43; 963–971.

5.Firouzbakhsh, F., Noori, F. Khalesi, M.K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiol. Biochem, 37; 833–842.

6.Gopalakannan, A. Arul, V. (2011). Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquac. Int, 19; 973–985.

7.Hussein, M.S., Zaghlol, A., El Hakim, N.F.A., El Nawsany, M., Abo-State, H.A. (2016). Effect of different growth promoters on growth performance, feed utilization and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). J. Fish. Aquat. Sci, 11; 370–377.

8.Kong, W., Huang, C., Tang, Y., Zhang, Di., Wu, Z. Chen, X. (2017). Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal mucosal barrier function damage and inflammation in grass carp(*Ctenopharyngodon idella*). Sci. Rep, 7; 1–11.

9.Liu, K.F., Chiu, C.H., Shiu, Y.L., Cheng, W., Liu, C.H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol, 28; 837–844.

10. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bøgwald, J. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 302; 1–18.

11. Naseri, S., Khara, H., Shakoori, M. (2013). Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) frys. J. Appl. Anim. Res, 41; 318–325.

12. Nakandakare, I.B., Iwashita, M.K.P., Dias, D.D.C., Tachibana, L., Ranzani-Paiva, M.J.T., Romagosa, E. (2013). Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. Acta SciAnim. Sci, 35; 365–370.

13. Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 431; 1–11.

14. Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N. (2011). Research in veterinary science modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Res. Vet. Sci, 91; 92–97.

15. Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A. Miandare, H.K. (2017). Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish Shellfish Immunol, 60; 65–71.

16. Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., Paknejad, H., Rameshi, H. (2019). Effect of dietary supplementation with apple cider vinegar and propionic acid on hemolymph chemistry, intestinal microbiota and histological structure of hepatopancreas in white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish Shell fish Immunol, 86; 900–905.

17. Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H., Gozari, M. (2019). Evaluation of some haemolymph biochemical properties and F - cell prevalence in hepatopancreas of white leg shrimp(*Litopenaeus vanammei*) after fed diets containing apple cider vinegar and propionic acid. Aquac. Res, 00; 1–9.

18. Ramos, M.A., Batista, S., Pires, M.A., Silva, A.P., Pereira, L.F., Saavedra,M.J. (2017). Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. Animal, 11; 1259–1269.

19. Ranjit Kumar, N., Raman, R.P., Jadhao, S.B., Brahmchari, R.K., Kumar, K. Dash,G. (2013). Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*(de Man, 1879).

Aquac. Int, 21; 387–403.
20. Reda, R.M., Selim, K.M. (2014). Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquac. Int, 23; 203–217.
21. Sargazi, H., Jafarian, H., Yelghi, S. Farhangi, M. (2014). Stress resistance, survival and growth performance of rainbow trout Fry (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with a commercial basillus probiotic. Fish. Sci. Technol, 3; 1-12. In Persian.
22. Sel, İ., Hisar, O., Yilma, S. Yigit, M. (2016). Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal water temperature. Mar. Sci. Technol. Bull, 4; 21–28.
23. Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. Lin, W.Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus strains* with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper Epinephelus coioides. Fish Shellfish Immunol, 29; 803–809.
24. Tang, L., Huang, K., Xie, J., Yu, D., Sun, L., Huang, Q. (2017). 1-Deoxynojirimycin from *Bacillus subtilis* improves antioxidant and antibacterial activities of juvenile *Yoshitomi tilapia*. Electron. J. Biotechnol, 30; 39–47.
25. Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. Campbell, T. (2012). Veterinary hematology and clnical chemistry 2nd ed. Ames, Iowa : Wiley-Blackwel.
26. Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu,C.S. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, Litopenaeus vannamei, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish Shellfish Immunol, 26; 339–344.
27. Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé,L. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture, 258; 470–478.
28. Yanbo, W., Zirong, X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim. Feed Sci. Technol, 127; 283–292.
29. Yu, M.C., Li, Z.J., Lin, H.Z., Wen, G.L. Ma, S. (2008). Effects of dietary Bacillus and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity, and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Int, 16; 471–480.
30. Zhang,Y., Shi,C., Wang,C., Lu,Z., Wang,F., Feng,J. (2018). Effect of soybean meal fermented with bacillus subtilis BS12 on growth performance and small intestinal immune status of piglets. Food Agric. Immunol., 29; 133–146.
30. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R. Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus. Aquaculture, 252; 516–524.
31. Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol, 33; 683–689.

.

Evaluation of the effect of Clustat probiotic (*Bacillus subtilis*) on some growth and hematological factor as well as intestine tissue of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

M. Mohammadi[1], **S. Pourmozaffar [2]**, M.Gozari[2]

1.Fisheries Department of Agricultural and Natural Resources College, Persian Gulf University, Boushehr, Iran
2.Agricultural Research Education and Extension Organization, Iranian Fisheries Science Research Institute, Persian Gulf and Oman Sea Ecology, Persian Gulf Mollusks Research Station, Bandar-e-Lengeh, Iran.
Sajjad5550@gmail.com

Received:2019.22. 11 **Accepted: 2019.22.12**

Abstract

Inroduction & Objective: At present, the use of probiotics as goodalternative for antibiotics is greatlyincreasing in aquaculture industry. The objectives of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation of *B. subtilis* probiotic (KEMIN ®) on growth and hematological parameters and also the morphology of intestine of rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Material and Method: In this study 135 fish with an average initial weight of 35.68 ± 2.5 g were fed diets supplemented with of probiotic after 50 days. Experimental treatments included control without probiotic (control group), 1 and 2% probiotic levels.Fish were randomly sampled at the end of experimental period. The blood was extracted from caudal vein of samples for measuringblood parameters (total red and white cells, hemoglobin, differential blood cell count).Intestinal morphology including height and width of villi, density and area of goblet cells were quantified for histological examination. Growth parameters was also determined.

Results: At the end of the feeding trial, fish fed with probiotic supplemented diets had significantly higher growth performance than control group ($p < 0.05$). In addition, fish fed with probiotic diets had significantly higher red blood cell, neutrophils and height of villi compared to the control group ($p < 0.05$). No significant difference of some hematological parameters (such as white blood cell, hematocrit, hemoglobin, neutrophils and monocyte) and intestinal morphology (width of villi, density and area of goblet cells) was observed in all groups ($p> 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the oral administration of *B. subtilis* possessed the beneficial and positive effects on growth and hematological factors as well as intestine tissue of rain bow trout.

Keywords: *B. subtilis*, Growth, hematological parameters, intestine tissue, *Oncorhynchos mykiss*.