

ارزیابی تجویز جیره‌ای *Lactobacillus plantarum* KC426951 پوشش‌دار شده بر رشد، درصد ماندگاری، شاخص‌های خون، سرم و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حمیده کردی^۱، علیرضا ولی‌پور^{۱*}، محمود حافظیه^۲، علیرضا شناور ماسوله^۳، سوده کردی^۴

*valipour40@gmail.com

۱- پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۴- گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

در این تحقیق اثر *Lactobacillus plantarum* KC426951 پوشش‌دار شده بر رشد، درصد ماندگاری، شاخص‌های خون، سرم و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تعداد ۹۰ ماهی با میانگین وزنی $12/94 \pm 0/35$ گرم با جیره‌های غذایی حاوی باکتری پوشش‌دار شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم شامل تیمار ۱ (10^7 CFU/g)، تیمار ۲ (10^8 CFU/g) و شاهد (جیره فاقد باکتری (T_0)) به مدت هشت هفته تغذیه شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، تیمارهایی که 10^7 CFU/g باکتری دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بیشترین افزایش وزن، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و کمترین ضریب تبدیل غذایی را دارا بودند ($P < 0/05$). اما درصد ماندگاری در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). در بررسی فاکتورهای خونی، تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای حاوی باکتری به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. در تیمار ۱، درصد نوتروفیل کمتر و درصد لنفوسیت بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P < 0/05$) درصد مونوسیت نیز در تیمار ۲ به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار ۱ بود ($P < 0/05$). میزان گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL، AST و ALP به طور معنی‌داری در تیمار ۱ بیشتر از دو تیمار دیگر و میزان پروتئین کل در این تیمار به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار ۲ بود ($P < 0/05$). اما اختلاف معنی‌داری در سایر عوامل خونی در بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0/05$). با توجه به نتایج، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمارهای حاوی باکتری (۱ و ۲) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و شمارش کلی باکتری در تیمار ۱ بطور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود ($P < 0/05$). بنابراین افزودن CFU/g 10^7 باکتری پوشش‌دار لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند اثرات مثبتی بر فاکتورهای رشد و سلامت این ماهی داشته باشد.

لغات کلیدی: لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار، شاخص‌های رشد، شاخص‌های خون، فلور باکتریایی روده، قزل‌آلای رنگین‌کمان

*نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی قزل آلائی رنگین کمان گونه‌ای گوشت‌خوار است که در سال‌های اخیر تولید آن در دنیا و در کشور ما در حال افزایش است بطوریکه ایران با تولید بیش از ۱۳۱ هزار تن در سال ۲۰۱۲ در زمره بیشترین تولیدکنندگان این گونه در دنیا قرار گرفته است (FAO, 2014). از آنجایی که تهیه جیره غذایی و تغذیه پر هزینه‌ترین بخش تولید می باشد، لذا امروزه علاوه بر تلاش برای تهیه جیره‌هایی با بالاترین کیفیت و بهترین ضریب تبدیل غذایی سعی بر تولید خوراک‌هایی است که بتواند توان ماهی در برابر انواع استرس‌ها و عوامل بیماریزا را نیز ارتقاء دهد.

پروبیوتیک واژه‌ای یونانی است که معنای تحت الفظی آن (برای زندگی) می‌باشد (Zivkovic, 1999) و در فارسی به آن زیست یار می‌گویند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در آبی پروری در راستای استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک جهت نیل به اهداف گوناگون نظیر بهبود و تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی، بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی انجام شده است (Nikoskelainen et al., 2003). باکتری‌های اسید لاکتیک یکی از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی هستند که در پرورش آبزیان به کار می‌روند (Panigrahi et al., 2012; Andani et al., 2011). قلجایی فرد و همکاران در سال ۱۳۹۵ تاثیر باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951 جداسازی شده از روده قزل آلائی رنگین کمان را بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب لاشه بچه ماهی قزل آلائی رنگین مورد را بررسی قرار دادند و بیان نمودند این باکتری می‌تواند به عنوان یک فاکتور مثبت جهت بهبود فلور باکتریایی روده، عملکرد رشد و ترکیب لاشه مورد استفاده قرار گیرد. اشنوخواه و همکاران (۱۳۹۲) تاثیر اشکال مختلف *Lactobacillus casei* را بر رشد و ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان بررسی کردند، نتایج این تحقیق نشان داد افزودن این باکتری به جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان باعث بهبود رشد و تقویت ایمنی این ماهی می‌گردد. Panigrahi و همکارانش در سال ۲۰۱۰، اثر *Lactobacillus*

rhamnosus JEM 1136 را بصورت مکمل غذایی بر پاسخ‌های ایمنی و ترکیب فلور روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان بررسی کردند که بهبود فلور باکتریایی روده را نشان داد.

پوشش‌دار کردن (Encapsulation) فرآیندی است که در آن ترکیبات فعال در ماده ثانویه (دیواره) بسته‌بندی می شوند. پوشش‌دار کردن سلول‌های باکتریایی پروبیوتیک، این سلول‌ها را از صدمات ناشی از عوامل و شرایط محیطی در حین تولید غذا، نگهداری و در طول دستگاه گوارش بویژه pH پایین معده و نمک‌های صفراوی روده، حفظ می کند (Zuidam and Nedovic, 2010). بنابراین در این تحقیق اثر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار (جداسازی شده از روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان) در دو غلظت بر رشد، ماندگاری، فاکتورهای خون، سرم و فلور باکتریایی روده قزل آلائی رنگین کمان که تا کنون انجام نشده است، بررسی گردید.

مواد و روش کار

برای انجام تحقیق ۹۰ عدد ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن $12/94 \pm 0/35$ گرم از بخش خصوصی واقع در استان گیلان، شهرستان رشت خریداری شد. همچنین باکتری *Lactobacillus plantarum* که از روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان استخراج شده بود از شرکت دانش بنیان زیست یار وارنا تهیه گردید. این باکتری با کد KC426951 در سال ۲۰۱۳ در بانک ژن (NCBI)

توسط Shenavar و همکاران (۲۰۱۳) ثبت شده است. پوشش‌دار کردن و شمارش باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951 پس از آن پوشش‌دار کردن باکتری با استفاده از آلژینات کلیسم به روش ژلاتینه کردن خارجی (Sheu and Marshall, 1993) صورت گرفت. برای این منظور ابتدا سدیم آلژینات (۳ درصد) در آب دیونیزه حل و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت. سپس یک قسمت باکتری 10^{12} CFU/g با چهار قسمت سدیم آلژینات مخلوط گردیده و بر روی همزن مغناطیسی با دور ۳۰۰ rpm قرار گرفت و مخلوط (۹۹ گرم روغن

فیزیولوژی (برای هر یک کیلوگرم غذا) معلق شده و سپس بر روی کل غذا به طور کامل اسپری و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد خشک و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به تیمار شاهد، غذای پلت اسپری شده با سرم فیزیولوژی خوراندند.

جدول ۱: فرمول جیره غذایی

Table 1: Diet formula

ردیف	ترکیبات	میزان در جیره (%)
۱	ژلاتین	۲/۵۰
۲	نشاسته	۹/۰۰
۳	آرد گندم	۷/۸۴
۴	آرد ذرت	۳/۰۰
۵	پودر ماهی	۴۸/۰۰
۶	پودر سویا	۱۲/۲۹
۷	سلولز	۲/۴۸
۸	روغن ماهی	۹/۸۵
۹	ویتامین C	۰/۰۲
۱۰	کولین کلراید	۰/۵۰
۱۱	متیونین	۱/۵۰
۱۲	لیزین	۱/۵۰
۱۳	مخلوط ویتامینی ^۱	۱/۵۰
۱۴	مخلوط معدنی ^۲	۰/۰۲

^۱ مخلوط ویتامینی: ویتامین A معادل ۱۶۰۰۰۰ IU، ویتامین D₃ معادل ۴۰۰۰۰۰ IU، ویتامین E معادل ۴۰ گرم، ویتامین K₃ به میزان ۲ گرم، ویتامین B₁ به مقدار ۶ گرم، ویتامین B₂ معادل ۸ گرم، ویتامین B₃ به میزان ۱۲ گرم، ویتامین B₅ به مقدار ۴۰ گرم، ویتامین B₆ معادل ۴ گرم، ویتامین B₉ به مقدار ۱۲ گرم، ویتامین B₁₂ معادل ۸ گرم، ویتامین H₂ به میزان ۰/۲۴ گرم، ویتامین C برابر ۶۰ گرم، اینوزیتول ۲۰ گرم، BHT ۲۰ گرم و کولین کلراید ۱۲ گرم (۰/۵٪ از مخلوط فوق در یک کیلوگرم مخلوط ویتامینی موجود است).

^۲ مخلوط معدنی: سولفات منگنز به مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سولفات مس برابر ۶ میلی گرم بر کیلوگرم، یدید پتاسیم معادل ۶ میلی گرم بر کیلوگرم، سولفات روی به مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و سولفات آهن به میزان ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم.

حیوانی بعلاوه ۱ گرم توپین ۸۰) به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه یک امولسیون یکنواخت و کدر در ظرف ایجاد گردید. سپس ۴۰ میلی لیتر از یک امولسیون حاوی کلسیم (۶۰ گرم روغن گیاهی بعلاوه ۰/۵۰ گرم توپین ۸۰ بعلاوه ۳۹/۵۰ گرم کلسیم کلراید ۰/۱۰ مولار) در بورت به آرامی به آن (روی همزن مغناطیسی (۱۰۰ rpm)) اضافه گردید. سپس دانک‌های ته نشین شده بوسیله سانتریفیوژ (۳۵۰۰) دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (جداسازی شده و با آب استریل شست و شو و در نهایت بوسیله فریز درایر به مدت نیم ساعت خشک گردید. برای بررسی بازده فرایند پوشش‌دار کردن، کپسول‌های معلق در پپتون واتر (PW) بوسیله کاغذهای صافی استریل، جداسازی شدند. مقدار یک گرم از میکروکپسول‌ها در ۹۹ میلی لیتر سدیم سیترات استریل ۱ درصد (pH تنظیم شده در حدود ۶) ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت. در طی این فرایند دیواره دانک‌های آلژینات تخریب و باکتری‌ها رها شدند. پس از این مرحله رقیق سازی و کشت در محیط MRS آگار صورت گرفت. کشت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد سپس تعداد باکتری‌ها با سه تکرار شمارش گردید (Mokarram et al., 2009). نتیجه شمارش ۱۰^۸ CFU/g بدست آمد.

آماده سازی غذا

برای تهیه جیره‌های آزمایشی مواد اولیه خشک، آسیاب و با یکدیگر مخلوط شده، سپس روغن و آب به آن‌ها اضافه گردید (جدول ۱). مخلوط خمیری پس از عبور از چرخ گوشت، داخل آون (به شکل رشته) با دمای حدود ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷ تا ۱۰ ساعت خشک شد و سپس به صورت پلیت درآمد و مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۲). جهت آماده سازی جیره تیمارهای مختلف، بعد از پوشش‌دار کردن باکتری، مقدار مورد نیاز باکتری (۱۰^۸-۱۰^۷ CFU/g) در غذا مطابق روش Merrifield و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در ۵۰ میلی لیتر سرم

$$SGR(\%/day) = \left[\frac{\ln W_t - \ln W_i}{T} \right] \times 100$$

ضریب تبدیل غذایی (Food Conversion Rate):

$$FCR = (C \times T) / WG$$

W_i : وزن اولیه ماهی (گرم)

W_f : وزن نهایی ماهی (گرم)

W_t : وزن ماهی در زمان مورد نظر (گرم)

T : طول مدت پرورش

C : مقدار غذای خورده شده روزانه (گرم)

درصد ماندگاری (Tacon, 1990):

$$SR(\%) = N_t / N_i \times 100$$

N_i : تعداد اولیه ماهی

N_t : تعداد ماهی در زمان مورد نظر

بررسی شاخص‌های ایمنی و فاکتورهای خونی

در پایان دوره آزمایشی از ماهیان به صورت تصادفی نمونه برداری گردید (۳ ماهی از هر تکرار) و خونگیری پس از بی‌هوشی ماهی‌ها با پودر گل میخک (۱۰۰ ppm) و خشک کردن کامل سطح بدن با استفاده از سرنگ از ورید ساقه دمی به عمل آمد. جهت اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی شامل گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید، HDL، LDL، پروتئین تام، آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و شاخص‌های ایمنی از جمله ACH50 و IgM نمونه‌های خون پس از جمع‌آوری از ماهیان سانتریفیوژ گردید و سرم جدا گشته و برای انجام آزمایشات بعدی در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی با استفاده از کیت‌های مخصوص و دستگاه اتوآنالایزر صورت گرفت (نوریان و همکاران، ۱۳۹۳). اندازه‌گیری شاخص‌های خون شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC)، هموگلوبین (HB)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC)، درصد نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل، نمونه-

جدول ۲: آنالیز جیره پایه

Table 2: Baseline diet analysis

ردیف	ترکیبات مغذی	میزان در جیره (%)
۱	پروتئین خام	۴۵/۰۰
۲	چربی خام	۱۴/۰۰
۳	رطوبت	۵/۷۰
۴	خاکستر	۵/۰۰
۵	کربوهیدرات	۲۴/۰۰
۶	فیبر	۵/۱۰
۷	انرژی خام (kcal/kg)	۴۷۱۰/۰۰

سیستم آزمایشی

قبل از شروع آزمایش ماهیان به مدت ۲۱ روز با محیط آداپته شدند و پس از زیست سنجی به صورت تصادفی در ۹ مخزن ۵۰۰ لیتری (۳۰ عدد در هر تیمار) ریخته شدند و با رژیم‌های غذایی مختلف T_0 ، T_1 و T_2 به مدت هشت هفته (دوبار در روز به میزان ۵ درصد وزن بدن در ماه اول و ۳ درصد وزن بدن در ماه دوم) تغذیه گردیدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و زیست سنجی هر ۱۴ روز یکبار صورت گرفت. میزان اکسیژن محلول، pH و دمای آب در طول آزمایش به صورت روزانه بررسی گردید. اکسیژن آب 8 ± 0.5 میلی‌گرم در لیتر، pH آب به طور میانگین 7.99 ± 0.20 و دمای آب 16.71 ± 1.35 درجه سانتی‌گراد بود.

بررسی شاخص‌های رشد و ماندگاری

برای بررسی رشد ماهیان و مقایسه بین تیمارها از شاخص‌های رشد شامل درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و میزان افزایش وزن بدن استفاده شد (Tacon, 1990).

افزایش وزن بدن (Weight Gain):

$$WG(g) = W_f - W_i$$

درصد افزایش وزن بدن (Percent Weight Gain):

$$PWG(\%) = (W_f - W_i) / W_i \times 100$$

ضریب رشد ویژه (Specific Growth Rate):

نتایج

رشد و ماندگاری

با توجه جدول شماره ۳ تیمارهایی که 10^7 CFU/g باکتری پوشش‌دار لاکتوباسیلوس پلانتاروم دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بیشترین افزایش وزن، بیشترین درصد افزایش وزن بدن، کمترین ضریب تبدیل غذا و همچنین بیشترین ضریب رشد ویژه را دارا بودند ($P < 0.05$). اما درصد بقا در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). همچنین درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه در تیمار حاوی 10^8 CFU/g باکتری با تیمار شاهد و تیمار حاوی 10^7 CFU/g باکتری اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). اما میزان افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذا در تیمار 10^7 CFU/g اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$).

فاکتورهای خونی و ایمنی

نتایج حاصل از این تحقیق همانطور که در جدول ۴ آورده شده است نشان داد تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای حاوی باکتری به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$), اما در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، درصد هماتوکریت، MCV، MCH، و MCHC اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). از نظر درصد انواع مختلف گلبول‌های سفید، به طور معنی‌داری در تیمار 10^7 CFU/g درصد نوتروفیل کمتر و درصد لنفوسیت بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P < 0.05$). درصد مونوسیت در تیمار 10^8 CFU/g به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار 10^7 CFU/g بود ($P < 0.05$) اما با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). همچنین در درصد ائوزینوفیل نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0.05$). میزان گلوکز و کلسترول نیز به طور معنی‌داری در تیمار 10^7 CFU/g بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P < 0.05$).

های خون در لوله‌های CBC حاوی مواد ضد انعقاد جمع آوری شد و به روش نوریان و همکاران (۱۳۹۳) اندازه گیری گردید. جهت محاسبه درصد هماتوکریت (HCT) نمونه‌های خون در لوله‌های مویینه جمع آوری و پس از انجام سانتریفیوژ درصد آن توسط خط کش هماتوکریت ریدر قرائت شد (حقیقی، ۱۳۸۸).

بررسی فلور باکتریایی روده

برای شمارش باکتری‌های روده در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تیمار بطور تصادفی صید و پس از بیهوشی توسط پودر گل میخک، با استفاده از پنبه الک ۷۰ درصد قسمت شکمی آن‌ها ضد عفونی گردید. در شرایط استریل ناحیه شکمی ماهیان با تیغ اسکالپل استریل برش و روده خارج شد. پس از تخلیه کامل روده، سه بار توسط سرم فیزیولوژی استریل شستشو و بعد از هموژنیزاسیون با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} از روده تهیه گردید. از رقت‌های تهیه شده روده به میزان ۰/۱ میلی لیتر روی محیط‌های کشت (Tryptic TSA) (Soy Agar) به منظور شمارش کلی باکتری‌های روده و در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک MRS تلقیح انجام شد. انکوباسیون پلیت‌های TSA در شرایط هوازی و MRS در شرایط بی‌هوازی به ترتیب در دمای 25°C و 30°C انجام و پس از انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت بر حسب واحد کلنی (CFU) در گرم مورد شمارش قرار گرفت (Merrifield et al., 2011).

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح کلی این تحقیق طرح کاملاً تصادفی بود. جهت آزمون داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون دانکن استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS 17 مورد ارزیابی قرار گرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ مشخص شد.

جدول ۳: تغییرات شاخص‌های رشد و درصد زنده مانی قزل آلای تغذیه شده با جیره‌های غذایی مختلف حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دار به مدت ۸ هفته

Table 3: Changes of growth indices and survival percentage of Rainbow trout fed with various diets containing coated *Lactobacillus plantarum* during 8 weeks

تیمارها/عوامل رشد	شاهد	تیمار حاوی 10^6 CFU/g <i>L. plantarum</i> (T ₁)	تیمار حاوی 10^4 CFU/g <i>L. plantarum</i> (T ₂)
(g) W _i	۱۳/۰۱±۰/۲۵	۱۲/۸۵±۰/۸۳	۱۲/۹۰±۰/۷۸
(g) W _f	۵۱/۹۸±۴/۱۷ ^b	۵۹/۹۲±۰/۴۵ ^a	۵۴/۴۷±۰/۳۱ ^b
(g) WG	۳۸/۹۷±۳/۹۲ ^b	۴۷/۰۸±۰/۳۹ ^a	۴۱/۵۸±۱/۰۹ ^b
(%) PWG	۲۹۹/۰۵±۲۴/۳۵ ^b	۳۶۸/۲۴±۲۶/۹۳ ^a	۳۲۴/۱۴±۲۸/۰۸ ^{ab}
(g/g) FCR	۰/۹۶±۰/۰۹ ^a	۰/۷۸±۰/۰۲ ^b	۰/۹۲±۰/۰۱ ^a
(%) SGR	۳/۰۷±۰/۱۴ ^b	۳/۴۳±۰/۱۳ ^a	۳/۲۱±۰/۱۵ ^{ab}
درصد ماندگاری	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰

حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری پوشش دار لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره غذایی بر فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان در ۸ هفته

Table 4: Effects of different dosages of coated *Lactobacillus plantarum* in diet on blood and immune factors of Rainbow trout during 8 weeks.

<i>L. plantarum</i>		تیمارها	
CFU/g ^{۱۰۶}	CFU/g ^{۱۰۴}	شاهد	عوامل خونی و ایمنی
۱۰/۹۰±۰/۲۰ ^a	۱۱/۳۰±۰/۲۰ ^a	۱۰/۰۰±۰/۶۰ ^b	(mm ³ ×10 ³) WBC
۱/۹۳±۰/۱۷	۱/۸۶±۰/۰۱	۱/۷۸±۰/۰۲	RBC (mm ³ ×10 ⁶)
۱۰/۰۰±۰/۵۰	۱۰/۰۰±۰/۰۶	۹/۲۵±۰/۲۵	g/dL HB
۵۵/۵۰±۳/۵۰	۵۶/۰۰±۳/۰۰	۵۱/۰۰±۱/۰۰	% HCT
۲۸۵/۰۰±۳/۰۰	۲۸۳/۰۰±۳/۰۰	۲۸۷/۰۰±۳/۰۰	FL MCV
۵۱/۵۰±۰/۵۰	۵۱/۰۰±۰/۰۰	۵۲/۰۰±۱/۰۰	pg MCH
۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۷/۵۰±۰/۵۰	۱۸/۰۰±۰/۰۰	g/dL MCHC
۱۸/۵۰±۰/۵ ^b	۲۲/۰۰±۲/۰۰ ^a	۲۴/۵۰±۱/۵۰ ^a	%neutrophils
۷۷/۵۰±۱/۵۰ ^a	۷۰/۰۰±۲/۰۰ ^b	۶۹/۵۰±۴/۵۰ ^b	%lymphocytes
۳/۰۰±۰/۰۰ ^b	۶/۰۰±۰/۰۰ ^a	۴/۵۰±۱/۵۰ ^{ab}	%monocytes
۱/۰۰±۱/۰۰	۲/۰۰±۰/۰۰	۱/۵۰±۱/۵۰	%Eosinophils
۳۱۷/۵۰±۲/۵۰ ^a	۲۷۸/۵۰±۳/۵۰ ^b	۲۶۸/۰۰±۲۵/۰۰ ^b	(mg/dL) cholesterol
۸۷/۵۰±۳/۵۰ ^a	۷۶/۰۰±۵/۰۰ ^b	۷۵/۰۰±۳/۰۰ ^b	(mg/dL) glucose
۶۱/۰۰±۸/۰۰	۶۸/۰۰±۳/۰۰	۶۶/۵۰±۱/۵۰	(mg/dL) HDL
۲۲۵/۰۰±۴۱/۰۰ ^a	۱۵۶/۵۰±۱/۵۰ ^b	۱۵۵/۰۰±۲۰/۰۰ ^b	(mg/dL) LDL
۵۶۳۶/۰۰±۱۰۲۱/۰۰	۵۴۵۸/۰۰±۲۵/۰۰	۵۵۳۱/۰۰±۳۳۹/۰۰	(u/L) LDH
۵۳۴/۰۰±۱۰۷/۰۰ ^a	۲۷۰/۰۰±۲۸/۰۰ ^b	۲۸۶/۵۰±۲۵/۵۰ ^b	(u/L) AST
۱۱/۰۰±۲/۰۰	۷/۰۰±۲/۰۰	۷/۲۵±۲/۲۵	(u/L) ALT
۴/۱۵±۰/۰۵ ^a	۳/۵۵±۰/۳۵ ^b	۳/۸۰±۰/۱۰ ^{ab}	(g/dL) Total protein
۴۰۹/۵۰±۸۸/۵۰ ^a	۲۳۵/۰۰±۶۰/۰۰ ^b	۲۴۵/۰۰±۲۷/۰۰ ^b	(mg/dL) Triglycerides
۱۹/۰۰±۰/۰۰	۱۹/۵۰±۲/۵۰	۲۲/۰۰±۶/۰۰	(mg/dL) IgM
۱۴۱/۰۰±۱۲/۰۰	۱۳۸/۰۰±۱۵/۰۰	۱۴۱/۰۰±۲۴/۰۰	(U %) ACH50
۱۸۱۰/۵۰±۴۱۶/۵۰ ^a	۸۶۷/۰۰±۲۱۶/۰۰ ^b	۸۸۲/۵۰±۱۵۲/۵۰ ^b	(u/L) ALP

حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

بحث

امروزه با توجه به مطالعات انجام شده علاقه به استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید از جمله پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است. در این تحقیق نیز تاثیر افزودن باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده در جیره ماهی قزل آلاي رنگين کمان با دو مقدار 10^8 و 10^7 CFU/g بر رشد، درصد ماندگاری، شاخص‌های خون، سرم و فلور باکتریایی روده این ماهی مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که اشاره شد یکی از مهمترین ویژگی پروبیوتیک‌ها افزایش ارزش غذایی و نیز بهبود پارامترهای رشد میزبان است. نتایج تحقیق حاضر نیز با نتایج تحقیقات پیشین مطابقت داشته به طوری که ثابت شد تیمارهایی که 10^7 CFU/g باکتری پوشش‌دار لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره را دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بیشترین افزایش وزن، بیشترین درصد افزایش وزن بدن، کمترین ضریب تبدیل غذا و همچنین بیشترین ضریب رشد ویژه را دارا بودند. در این تحقیق تیمار حاوی 10^8 باکتری پوشش‌دار در هیچ یک از شاخص‌های رشد اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت همچنین در درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه اختلاف معنی‌داری بین این تیمار و تیمار حاوی 10^7 باکتری پوشش‌دار مشاهده نگردید. همچنین درصد ماندگاری اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نداشت. به نظر می‌رسد که افزایش رشد مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل افزایش اشتها و خوراک مصرفی، همچنین افزایش فعالیت آنزیمی توسط پروبیوتیک‌ها باشد که باعث بهبود عملکرد دستگاه گوارش می‌شوند (Gatesoupe, 1999). همسو با این تحقیق بهبود شاخص‌های رشد در تیمارهای پروبیوتیکی را می‌توان در برخی تحقیقات دیگر نیز مشاهده کرد. صفری و یعقوب زاده (۱۳۹۶) بیان کردند استفاده از باکتری لاکتوباسیلوس در جیره ماهی قزل آلاي رنگين کمان منجر به تقویت شاخص‌های رشد و بقاء در این ماهی گردید. همچنین مشخص شد لاکتوباسیلوس پلانتاروم به میزان 10^7 CFU/g در جیره قزل آلاي رنگين کمان، فلور

در میزان HDL، LDH و ALT بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$) اما تری گلیسرید، AST، LDL و ALP در تیمار 10^7 CFU/g به طور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود ($P<0.05$). میزان پروتئین کل نیز در این تیمار به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار 10^8 CFU/g بود ($P<0.05$) ولی این اختلاف با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. میزان IgM و ACH50 نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0.05$).

فلور باکتریایی روده

نتایج حاصل از این تحقیق اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بین تیمار حاوی 10^7 و 10^8 CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با شاهد نشان داد ($P<0.05$) و در این تیمارها تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بطور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین شمارش کلی باکتری در تیماری که 10^7 CFU/g باکتری دریافت کرده بود به طور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود ($P<0.05$). اما بین تیمار شاهد و تیمار 10^8 CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم اختلاف معنی‌داری در شمارش کلی باکتری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۵).

جدول ۵: تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری پوشش‌دار لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره غذایی بر فلورباکتریایی روده ماهی قزل آلاي رنگين کمان در ۸ هفته.

Table 5: Effects of different dosages of coated *Lactobacillus plantarum* in diet on gut bacterial flora of Rainbow trout during 8 weeks

تیمارها	Total count bacteria (Log CFU/g)	Lactic acid bacteria (Log CFU/g)
T ₀	$6/0.5 \pm 0/0.4^b$	$0/5.7 \pm 0/0.6^b$
T ₁	$6/2.3 \pm 0/1.3^a$	$2/5.7 \pm 0/1.1^a$
T ₂	$5/9.3 \pm 0/0.1^b$	$2/6.7 \pm 0/0.3^a$

حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

باکتریایی روده، عملکرد رشد و ترکیب لاشه را بهبود داد اما میزان 10^8 CFU/g باکتری اختلاف معنی‌داری در این پارامترها در مقایسه با تیمار شاهد نداشت (قلجایی فرد و همکاران، ۱۳۹۵). جعفریان و همکاران (۱۳۸۷) بیان کردند باسیلوس‌های پروبیوتیک قابلیت بالایی در افزایش معیارهای رشد لاروهای ماهی قزل آلا دارند و در توسعه جیره‌های کاربردی این ماهی سودمندند. همچنین استفاده از لاکتوباسیلوس پلانترام به مدت ۳۰ روز در جیره ماهی تیلاپپای نیل، نرخ رشد را در مقایسه با گروه شاهد بهبود داد (Abumourad et al., 2013). درصد ماندگاری نیز در ماهیان قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با *L. plantarum* CLFP 238 در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت (Vendrell et al., 2008). همچنین Essa و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ماهیان تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با *L. plantarum* NIOFSD018 در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری رشد بهتری داشتند و مصرف غذا و فعالیت‌های آنزیمی آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در دستگاه گوارش آن‌ها بهبود یافته بود و وزن نهایی و کارایی غذایی نیز افزایش یافته بودند. Sultana و همکاران (۲۰۰۰) بیان کردند میزان ماندگاری باکتری‌های پوشش‌دار شده *Bifidobacterium* و *Lactobacillus acidophilus* spp. در ماست نسبت به باکتری‌های آزاد بیشتر بود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای حاوی باکتری به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود اما در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، درصد هماتوکریت، MCH، MCHC و MCV همچنین در میزان HDL، LDH، ALT، IgM و ACH50 اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد. از نظر درصد انواع مختلف گلبول‌های سفید، به طور معنی‌داری در تیمار 10^7 CFU/g درصد نوتروفیل کمتر و درصد لنفوسیت بیشتر از دو تیمار دیگر بود. درصد مونوسیت در تیمار 10^8 CFU/g به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار 10^7 CFU/g بود اما با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین نتایج اختلاف معنی‌داری در درصد

ائوزینوفیل نشان نداد. حسینی و همکاران (۱۳۹۳) بیان نمودند نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص آن و روش‌های مختلف افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی به طور قابل توجهی بر پارامترهای بیوشیمیایی خون اثر می‌گذارد. در این تحقیق میزان گلوکز و کلسترول، تری گلیسرید AST، LDL و ALP در تیمار 10^7 CFU/g به طور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود. مطالعات قبلی نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی ماهی تیلاپپای نیل منجر به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌گردد. در نتیجه، می‌توانند سبب تحریک، توسعه و رشد پرزهای سطح غشای سلول‌های انتروسیست روده‌ای شوند. افزایش این پرزها منجر به جذب بیشتر کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و در نتیجه، افزایش بیشتر وزن می‌شوند (Lara-Flores, 2011). میزان پروتئین کل نیز در این تیمار به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار 10^8 CFU/g بود. Valipour و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک (*Pedococcus acidilacticus*) بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و برخی فاکتورهای خونی بچه ماهی سفید را مورد بررسی قرار دادند، نتایج حاصل از این تحقیق وجود اختلاف معنی‌داری را در تعداد کل گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، MCH، MCHC، میزان گلوکز، پروتئین، LDL، HDL، آمیلاز و لیپاز خون در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی نشان داده و روند مشابهی نیز در مورد تعداد لنفوسیت‌های خون مشاهده گردید. همچنین این بررسی نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *P. acidilactici* موجب بهبود پارامترهای رشد و شاخص‌های خونی در بچه ماهیان سفید گردید. نتایج حاصل از تحقیقات اسدی‌خامی و همکاران (۱۳۹۶) نیز نشان داد که افزودن پروبیوتیک *Pedococcus acidilactici* به جیره غذایی بچه ماهیان سیم باعث افزایش عملکرد رشد، کارایی تغذیه و همچنین بهبود شاخص‌های هماتولوژیک و ایمنی در ماهیان می‌شود. بنابراین، می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی بچه ماهیان سیم باشد. شناور ماسوله (۱۳۹۱) بیان کرد

Pseudomonas aeruginosa و *aureus* می‌شود. همچنین Jatoba و همکاران (۲۰۱۱) نتیجه گرفتند که پس از تغذیه ماهی تیلاپای نیل با لاکتوباسیلوس پلانتاروم به مدت ۱۲ هفته، تعداد باکتری‌های هتروتروفیک زنده روده ماهی کاهش و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیکی افزایش یافت.

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان پیشنهاد کرد، بکارگیری این باکتری به صورت پوشش‌دار با غلظت 10^7 CFU/g در جیره ماهی قزل آلا رنگین کمان باعث بهبود فاکتورهای رشد و برخی فاکتورهای ایمنی و همچنین افزایش میزان باکتری‌های اسید لاکتیک در روده می‌شود. اما استفاده از 10^8 CFU/g در جیره در مقایسه با شاهد تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد نداشت.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ گونه کمک و کوششی دریغ نورزیدند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- اسدی خمایی، س.، مورکی، ن. و ولی پور، ع.، ۱۳۹۶. تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی سیم *Abramis brama orientalis*. فصلنامه علمی-پژوهشی علوم و فنون شیلات، ۶(۱): ۱-۱۲.
- اشنوخواه، م.، توکمه چی، ا.، فرخی، ف. و منافسر، ر.، ۱۳۹۲. مقایسه‌ی تأثیر اشکال مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کارژی بر رشد و ایمنی ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله دامپزشکی ایران، ۹(۴): ۲۵-۳۵.
- جعفریان، ح.ا.، مروت، ر.ا. و شیرزاد، ح.، ۱۳۸۷. بکارگیری دافنی ماگنای (*Daphnia magna*) غنی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی و تأثیر آنها بر رشد لاروهای ماهی قزل آلا رنگین کمان

استفاده از *Lactococcus lactis* JF831150 استخراج شده از روده تاس ماهیان در تغذیه آن‌ها به مدت ۵۶ روز منجر به بهبود معنی‌داری در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، فعالیت لیزوزیم، فعالیت آلترناتیو کمپلمان، هموگلوبین، گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین ذره‌ای، اتوزوفیل و نوتروفیل می‌شود و مصرف *L. lactis* JF831150 می‌تواند در بهبود شاخص‌های رشد، کارایی غذا و بهداشت تاسماهی ایرانی به عنوان یک پروبیوتیک احتمالی موثر باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق با افزایش میزان باکتری جیره تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده به طور معنی‌داری افزایش یافت بطوریکه بیشترین میزان باکتری های اسید لاکتیک در روده در تیمار حاوی 10^8 و 10^7 CFU/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشاهده شد. اما شمارش کلی باکتری در تیماری که 10^7 CFU/g باکتری دریافت کرده بود به طور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود و بین تیمار شاهد و تیمار حاوی CFU/g 10^8 باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همسو با این مطالعات در میگوی پنئوس مونودون استفاده از پروبیوتیک، توازن میکروب‌های روده ای را بهبود داد و با بهتر کردن جذب غذایی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی، منجر به بهبود رشد گردید (Das et al., 2006). افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در روده‌ی بچه ماهی قزل آلا می‌تواند به دلیل قدرت جاگیری بالای این باکتری‌ها در روده باشد، از طرفی با توجه به اینکه این باکتری‌ها قادر هستند مواد آنتی بیوتیکی تولید کنند، از این رو این ترکیبات احتمالاً می‌توانند جمعیت باکتری‌های دیگر را کاهش دهد یا باکتری پلانتاروم قادر است در محیط زیستی خود در رقابت بر سر مواد مغذی بر باکتری‌های دیگر غلبه کند و در نتیجه رشد سریع‌تر، محیط را اشغال نماید (Moriarty, 1998). Lash و همکاران (۲۰۰۵) نیز بیان کردند که لاکتوباسیلوس پلانتاروم باکتریوسینی تولید می‌کند که مانع رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شامل *Listeria* *Escherichia coli* *innocua* *Staphylococcus*

- Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. Journal of Applied Sciences Research, 9(1):572-582.
- Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkini, S. and SheikhZadeh, N., 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology, 28(5): 728-734. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2012.01974.x.
- Das, B.K., Samal, S.K., Samantaray, B.R., Sethi, S., Pattnaik, P. and Misha, B.K., 2006. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 253(1-4): 17-24. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.028.
- Essa, M.A., EL-Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboor, S.M., Esmael, N.A. and Lall, S.P., 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the Arabian Aquaculture Society, 5(2): 143-162.
- FAO Global Aquaculture Production (online query), 2014. Statistical information, Fisheries and Aquaculture Department. <http://www.fao.org>. Cited August 2014.
- حسینی، ع.ر، اورجی، ح.، یگانه، س. و شهابی، ح.، ۱۳۹۳. تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی روی رشد، فاکتورهای خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۲): ۳۵-۴۵.
- حقیقی، م.، ۱۳۸۸. روشهای آزمایشگاهی خون شناسی ماهی. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۸۳ صفحه.
- شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۱. شناسایی باکتریهای اسید لاکتیک روده بچه تاسماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) و کارایی آنها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنو فیزیولوژی. پایان نامه، دانشکده دامپزشکی گروه بیماریهای آبزیان دانشگاه تهران.
- صفری، ر. و یعقوب زاده، ز.، ۱۳۹۶. تاثیر باکتری *Lactobacillus* بر شاخص‌های رشد، بقا و مقاومت ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری *Streptococcus iniae* مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۵): ۱۳۱-۱۳۹.
- قلجایی فرد، ا.، خارا، ح. و شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۵. اثر باکتری *Lactobacillus plantarum* جداسازی شده از روده قزل آلاي رنگین کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و فنون شیلات، ۵(۲): ۱۱۱-۱۲۴.
- نوریان، م.، شجیعی، ه.، محمدنژاد شמושکی، م.، ۱۳۹۳. تأثیر سم دیازینون بر روی فاکتورهای خونی ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). زیست شناسی جانوری، ۷(۲): ۹۹-۱۰۶.
- Abumourad, I.M.K., Abbas, W.T., Awaad, E.S., Authman, M.M.N., El- Shafei, K., Sharaf, O.M., Ibrahim, G.A., Sadek, Z.I. and El- Sayed, H.S., 2013. Evaluation of

- Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2):147-165. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00187-8.
- Jatobá, A., Vieira, F.d-N., Buglione-Neto, C.C., Mourio', J.L.P., Silva, B.C., Seiffter, W.Q. and Andreatta, E.R., 2011.** Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4): 725-732. DOI: 10.1007/s10695-011-9472-5.
- Lara-Flores, M., 2011.** The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2(12): 471-478.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H. and Gourama, H., 2005.** Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22(2-3): 199-204. DOI: 10.1016/j.fm.2004.03.006.
- Merrifield, D.L., Bradley G., Harper G.M., Baker R.T.M., Munn C.B. and Davies S.J., 2011.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 17(1): 73-79. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x.
- Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, M.B.H. and Shahidi, F., 2009.** The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42(8): 1040-1045. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.04.023.
- Moriarty, D.J.W., 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164(1-4): 351-358. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00199-9.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 15(5): 443-452. DOI: 10.1016/S1050-4648(03)00023-8.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T., 2010.** Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4): 969-977. DOI: 10.1007/s10695-009-9375-x.
- Panigrahi, A., Viswanath, K. and Satoh, S., 2011.** Real-time quantification of immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture Research*, 42(7): 906-917. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.02633.x.
- Shenavar Masouleh, A., Soltani, M., Pourkazemi, M., Azizzadeh, L., Alizadeh, M., Jalilpour, J., Masoumzadeh, M., Bazari Moghaddam, S., Gheybi, S. and**

- Fatemi, M., 2013.** *Lactobacillus plantarum* strain Sam10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KC426951.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/449043398>.
- Sheu, T.Y. and Marshall, R.T., 1993.** Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of food science*, 58(3): 557-561. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb04323.x.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N. Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K., 2000.** Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology*, 62(1-2): 47-55. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00380-9.
- Tacon, A.G.J., 1990.** Standard methods for the fingerlings channel catfish. *Journal of the World nutrition and feeding of farmed fish* and shrimp. Argent Laboratories Press, pp: 454.
- Valipour, A.R., Hamed, N. and Abdollahpour, H., 2013.** The effect of probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on blood parameters of fingerlings Kutum, *Rutilus kutum*. *Aquaculture Europe*, 14: 239-241.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Blas, I.d., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O. and Múzquiz, J.L., 2008.** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(4): 337-345. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.04.002.
- Zivkovic, R., 1999.** Probiotics or microbes against microbes. *Acta Medica Croatica*, 53(1):23-28.
- Zuidam, N.J. and Nedovic, A.V., 2010.** Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer, New York, USA. 400p.

Evaluating the effects of dietary intake of encapsulated *Lactobacillus plantarum* KC426951 on growth, survival rate, blood and serum factors and gut bacterial flora of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Kordi H.¹; Valipour A.R.^{1*}; Haphezeh M.²; Shenavar Masouleg A.R.³; Kordi S.⁴

*valipour40@gmail.com

1-Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran

2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3-International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

4-Department of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In this study, the effects of *Lactobacillus plantarum* KC426951 on growth, survival rate, blood and serum factors and gut bacterial flora of rainbow trout were investigated. For this purpose, 90 fish with an average weight of 12.94 ± 0.35 g were fed for 8 weeks with the diets containing different amounts of encapsulated *Lactobacillus plantarum* including treatment 1 (10^7 CFU/g), treatment 2 (10^8 CFU/g) and the control treatment without *Lactobacillus plantarum* (T_0). The results of this study showed that the highest weight gain, percent of body weight gain, specific growth rate and the lowest feed conversion rate were observed in the treatments 1 which were significantly different as compared to those of the control treatment ($P < 0.05$). However, the amounts of survival rates were not significantly different among various treatments ($P > 0.05$). In blood factors, the numbers of white blood cells in the treatments containing bacteria were significantly higher than the control treatment ($P < 0.05$). The amount of neutrophil in the treatment 1 was lower than that of the other treatments, whereas the amount of lymphocyte in the treatment 1 was higher than that of the other treatments ($P < 0.05$). The amount of monocyte in the treatment 2 was significantly higher than that of the treatment 1 ($P < 0.05$). The levels of glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, AST and ALP were significantly higher in the treatment 1 than those of the other treatments. The amount of total protein in the treatment 1 was significantly higher than that of the treatment 2 ($P < 0.05$). But there were not significant differences among various treatments in other blood parameters ($P > 0.05$). According to the results, the numbers of lactic acid bacteria in the treatments containing bacteria (1 and 2) were significantly higher than the control treatment. The total bacterial count in the treatment 1 was significantly higher than that of the other treatments ($P < 0.05$). Therefore, the addition of 10^7 CFU/g of encapsulated *Lactobacillus plantarum* bacteria to fish diet could have positive effects on the growth and health parameters of rainbow trout.

Keywords: Encapsulated *Lactobacillus plantarum* KC426951, Growth indices, Blood factors, Gut bacterial flora, Rainbow trout

*Corresponding author