

## مقایسه تأثیر باسیلوس های مستخرج از روده لاروماهیان خاویاری *persicus* و *Huso huso* با پروبیوتیک های تجاری بر رشد و بقاء لاروماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حجت الله جعفریان<sup>۱\*</sup> مهدی سلطانی<sup>۳</sup> مهدی طاعتی<sup>۳</sup> علی رضا نظریور<sup>۴</sup> روح اله مروت<sup>۵</sup>

۱) مجتمع آموزش عالی گنبد کاووس، گلستان، ایران.

۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران.

۴) پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۵) کارشناس شیلات.

(دریافت مقاله: ۲۸ دی ۱۳۸۸، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۳۸۹)

### چکیده

بکارگیری باکتری های پروبیوتیکی به عنوان یک استراتژی مهم برای ایجاد محصولات قابل تجدید از طریق کنترل بیولوژیکی در سیستم های پرورشی لاروهای ماهی و سخت پوستان پیشنهاد شده است. جمعیت باکتریایی در روده لارو با باکتری های مرتبط با تخم ها، آب تانک های پرورشی و غذای زنده سرچشمه می گیرد. این مطالعه در جهت تعیین اثرات پروبیوتیک های تجاری و بومی بر معیارهای رشد و نرخ بقاء لاروماهی قزل آلائی رنگین کمان هدفمند شد. لاروهای قزل آلا (۱±۸۵ میلی گرم) با جیره بیومار تغذیه شدند. جیره های آزمایشی با سه مخلوط باکتریایی زیست یار شامل لاکتوباسیلوس، باسیلوس تجاری و باسیلوس جدا شده از روده تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*)، با درسه سطح (۴/۳۰، ۵/۳۰ و ۶/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم غذا) مکمل شدند و به وسیله لاروهای ماهی قزل آلائی رنگین کمان در ۹ تیمار آزمایشی تغذیه گردیدند. تیمار شاهد از جیره بدون مکمل سازی تغذیه شد. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت. نرخ تغذیه بر اساس ۱۰ درصد وزن بدن، برای ۶ بار در روز انجام شد. در پایان دوره (۳۲ روز)، ماهیان بیومتری شده و توسط شوک های حرارتی، شوری، قلیائیت و اسیدیته آزمایش گردیدند. بالاترین میانگین نرخ رشد ویژه (۷۷/۶۱±۰/۴ درصد)، ضریب رشد حرارتی (۳۲/۴۴±۰/۳ درصد) و کارایی تغذیه (۵۶/۲۵±۰/۰۸ درصد) در تیمار A<sub>۱</sub> به دست آمد. تیمار A<sub>۱</sub>، A<sub>۲</sub>، B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub>، L<sub>۱</sub> و L<sub>۳</sub> تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشتند (p<۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی بهتری در تیمار A<sub>۱</sub> (۳۳/۹۲±۰/۲۰ درصد) و L<sub>۳</sub> (۲۰/۹۲±۰/۲۰ درصد) به دست آمد. در آزمایش مقابله با شوک حرارتی، بالاترین زمان بقاء در تیمار B<sub>۱</sub> (۲۸/۳۹±۹۴/۳۳ ثانیه) به دست آمد. نتایج آزمایش های مقابله با استرس قلیائیت و اسیدیته نشان داد که بهترین زمان بقاء، در تیمار A<sub>۱</sub> (به ترتیب ۷۴/۶۷±۰/۵۷ و ۲۷۵/۶۷±۰/۲۰ و ۳۷۴±۰/۲۰ ثانیه) بود و تمامی تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشتند (p<۰/۰۵). هیچ اختلاف معنی داری بین تیمارها در آزمایش مقابله با شوری، مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

واژه های کلیدی: باکتریای زیست یار، تست مقابله، زمان بقاء، لارو قزل آلائی رنگین کمان، نرخ رشد ویژه.

افزودنی های دارویی می باشند که از سال ۱۹۵۰ به غذاهای ماهی استفاده می گردد (۱). با توجه به ایجاد مقاومت دارویی در میزبان که از محدودیت های آنتی بیوتیک ها محسوب می گردد، اهمیت باکتری های زیست یار یا پروبیوتیکی کاملاً آشکار گردید، به طوری که باکتری های زیست یار که باکتری های مفیدی می باشند و یا ترکیبات تولید شده توسط آنها، با اثرات مفید برای میزبان، در آبی پروری برای کنترل بیماری ها و همچنین به عنوان مکمل هایی برای بهبود رشد لاروهای ماهی استفاده شده و در برخی موارد نیز به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی برای لاروهای ماهی بکار گرفته می شوند (۱۵، ۱۶). تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری های زیست یار در آبی پروری صورت گرفته است. برخی از عملکردهای اثبات شده در خصوص این باکتری ها شامل دفع رقابتی برای سایر باکتری ها و نیز بازدارنده های پروبیوتیکی برای جلوگیری از تجمع

### مقدمه

پرورش ماهی قزل آلا در کشورمان، از نظر اقتصادی مهم بوده و عفونت های باکتریایی به نظر می رسد که یکی از دلایل کاهش سطح تولید در مزارع پرورشی این ماهی باشد (۲). موفقیت یا شکست در برنامه های آبی پروری وابسته به شرایط پرورشی لاروهای ماهی می باشد، به عبارت دیگر عفونت های ناشی از باکتری هادر شرایط پرورشی، ممکن است باعث افزایش مرگ و میر و کاهش تولید شود (۱۹). از سویی دیگر برای توقف یا کاهش چنین اتفاقات نامطلوب در پرورش لاروهای ماهی، ممکن است از افزودنی های خاصی با غذاهای آنها استفاده شود که برای سلامتی و افزایش کارایی غذا مفید واقع شود، در این میان، آنتی بیوتیک ها از جمله



آزمایش در نظر گرفته شد. مخلوط اول شامل دو گونه از باسیلوس های زیست یار تحت عنوان باسیلوس سابیتیلیس (*Bacillus subtilis*) و باسیلوس لیکنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*) در قالب یک فرآورده پودری از شرکت پروتکسین (ایران - نیکوتک) تهیه گردید. غلظت باکتری در این فرآورده معادل  $10^8 \times 1$  واحد کلنی در هر گرم بود. محصول دوم شامل فرآورده میکروبی پودری بود که در آن ۴ گونه از لاکتوباسیلوس های زیست یار شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*)، لاکتوباسیلوس دلبروکی (*L. dlbrueckii*)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*L. acidophilus*) و لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*L. rhamnosus*)، تحت عنوان تجاری پروتکسین، از شرکت نیکوتک تهیه شد. همچنین در این فرآورده میکروبی باکتری های دیگری نظیر بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*)، استرپتوکوکوس سالیواریوس (*Streptococcus salivarius*) و انتروکوکوس فاسیوم (*Enterococcus faecium*) نیز بکار رفته بود. این محصول باکتریایی حاوی تعداد  $10^9 \times 2$  سلول باکتری در هر گرم بود.

**باکتری های جدا شده از روده ماهی:** مخلوط باکتریایی سوم شامل باکتری های ایزوله شده از روده لارو ماهیان خاویاری بود. ۲۰ قطعه از لاروهای تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*huso huso*) انتخاب و پس از ۲۰ ساعت گرسنگی، در عصاره گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بیهوش شدند. جهت رفع باکتری های سطح بدن لاروها، نمونه های ماهی در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفت (۲۱) و سپس با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. ناحیه شکمی لاروها با استفاده از تیغ جراحی استریل شکافته و روده آنها پس از جداسازی، در هاون چینی استریل هموژن گردید. پس از تهیه هموژن با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل (w/v NaCl) ۰/۸۷ درصد) رقت های سریالی در دامنه  $10^{-1}$  تا  $10^{-8}$  تهیه گردید. از رقت های فوق تحت شرایط استریل توسط نمونه بردار، حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به پلت حاوی محیط های کشت باسیلوس سرئوس آگار و تریپتیک سوی آگار منتقل و در سطح آن پخش گردیدند (۲۶). پلت های فوق به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد انکو یاسیون و پرگنه های تشکیل شده مجدداً در محیط کشت تریپتیک سوی آگار به صورت خالص کشت گردیدند. سرانجام در آزمایشگاه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشگاه تهران، بر اساس برخی مشخصات فنوتیپی نظیر شکل باکتری، پرگنه ها و نیز بر اساس واکنش رنگ پذیری به گرم و همچنین برخی از تست های بیوشیمیایی استاندارد از جمله واکنش کاتالاز، اکسیداز، تخمیر گلوکز، آرابینوز، اتولیز سترات، واکنش ایندول تولید گاز سولفید هیدروژن ( $H_2S$ )، تغییر رنگ متیل رد، تست وی - پی و مقاومت در برابر درصد های مختلف شوری (صفر، دو و سه درصد) (۲۵)، جنس کورینه باکتریوم (*Corynebacterium sp*) و باسیلوس مایکودیس (*B. mycoides*) جدا سازی و سپس در محیط

باکتری های بیماریزا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده رشد دیگر باکتری ها و یار قابت برای غذا و مکان و تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک های محیطی را می توان ذکر کرد (۱۵). مطالعات مختلف در خصوص ارزیابی دفع رقابتی باکتری های بیماریزا توسط باکتری های زیست یار (۱۵، ۲۲) و همچنین تحریک سیستم ایمنی ماهی قزل آلا با برخی باکتری های زیست یار انتخابی انجام شده است (۱۶، ۲۰، ۲۲، ۲۴). باسیلوس های زیست یار با قابلیت تولید آنتی بیوتیک، اسیدهای آمینه، آنزیم های خارج سلولی و اثرات مثبت غذایی و عدم گزارش از بیماریزا بودن آنها برای جانوران آبی، با گسترش زیادی در صنعت آبی پروری مورد استفاده قرار می گیرند (۱۳).

Noh و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Bogut و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز اثبات کردند که پروبیوتیک های تجاری تهیه شده از باکتری استرپتوکوکوس فاسیوم (*Streptococcus faecium*) در طی مکمل سازی با جیره های ماهی کپور موجب بهبود کارایی تغذیه و رشد در آنها شدند. Yanbo و Zirong در سال ۲۰۰۶ پیشنهاد کردند که افزودن باکتری های زیست یار، باعث کاهش هزینه های پرورش ماهیان می گردد. نتایج خوبی از بکارگیری سویه های باسیلوسی زیست یار تجاری در افزایش رشد و بقاء لارو ماهی قزل آلا، از طریق مکمل سازی با جیره های آزمایشی به دست آمد (۱۸). Ziaei-Nejad و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که باسیلوس های زیست یار تاثیر بسیار موثری در رشد و بازماندگی لاروهای میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) داشتند. در مدیریت میکروبی، گونه های بومی ایزوله شده از دستگاه گوارش آبزیان، کاربرد بسیار مهمی را در اهداف آبی پروری ایفاء نموده است. تحقیقات مشابهی توسط Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ با باسیلوس سیرکولانس (*circulans*) و *Bacillus* ایزوله شده از روده ماهی رو هو (*Labeo rohita*) در جیره های مکمل شده آنها صورت گرفت (۹، ۱۰). همچنین باکتری لاکتوباسیلوس فروکتیورانس (*Lactobacillus fructivorans*) ایزوله شده از شانک ماهی (*Sparus auratus*) و نیز لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*plantarum*) *L.* ایزوله شده از مدفوع انسان، پس از غنی سازی با ناپلی آرتیمیا فرانسیسکانا در طی تغذیه، باعث افزایش رشد و بقاء این ماهی گردید (۶). هدف از این مطالعه، تأثیر ۳ مخلوط باکتریایی زیست یار شامل باسیلوس و لاکتوباسیلوس های تجاری و باسیلوس های ایزوله شده از روده ماهیان خاویاری در طی مکمل سازی با جیره های آزمایشی بر رشد و مقاومت لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان در مقابله با استرس های مختلف بود. این تحقیق می تواند در بکارگیری باکتری های پروبیوتیکی بومی و تجاری در راستای رشد و بقاء لاروهای ماهی قزل آلا رنگین کمان در کشورمان بسیار مفید واقع گردد.

## مواد و روش کار

مخلوط های باکتریایی تجاری: سه مخلوط باکتریایی مجزا برای این



شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. در گروه باسیلوس های زیست یار تجاری، لاروهای ماهی قزل آلا در قالب ۳ تیمار آزمایشی B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub> و B<sub>۳</sub> که هر یک بطور جداگانه به ترتیب از سه جیره مکمل شده با این باسیلوس ها در غلظت های (۴/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، (۵/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، و (۶/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، باکتری در هر گرم جیره، تغذیه نمودند. در گروه لاکتوباسیلوس های زیست یار نیز سه تیمار آزمایشی L<sub>۱</sub>، L<sub>۲</sub>، L<sub>۳</sub> از جیره هایی با غلظت های (۴/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، (۵/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، و (۶/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، باکتری در هر گرم جیره، تغذیه نمودند. همچنین در گروه باسیلوس های جدا شده از ماهیان خاویاری نیز لاروهای ماهی در ۳ تیمار آزمایشی A<sub>۱</sub>، A<sub>۲</sub>، A<sub>۳</sub> از جیره های مکمل شده با این باسیلوس ها به ترتیب در سه سطح (۴/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، (۵/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، و (۶/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، باکتری در هر گرم جیره، تغذیه گردیدند. نرخ تغذیه لاروهای ماهی بر اساس جداول استاندارد غذایی (دمای آب - وزن ماهی) به میزان ۱۰ درصد وزن بدن و در ۶ وعده غذایی در روز صورت گرفت (۱۷). در تیمار شاهد لاروهای قزل آلا رنگین کمان از جیره فاقد باسیلوس های زیست یار تغذیه شدند. در هر روز باقیمانده غذایی با استفاده از میکرو پی پت از حوضچه ها جمع آوری و از کل غذای عرضه شده کسر و غذای خورده شده روزانه محاسبه گردید (۱۰). این تحقیق در بهار ۱۳۸۷ در آزمایشگاه هیدرو بیولوژی دانشکده کشاورزی مجتمع دانشگاهی گنبد کاووس به مدت ۳۲ روز کاری صورت پذیرفت.

**معیارهای رشد:** زیست سنجی ماهیان به فواصل هر ۵ روز یک بار صورت گرفت و بر مبنای ۸ درصد از وزن توده زنده لاروهای ماهی میزان جیره روزانه تعیین گردید. در انتهای دوره آزمایش وزن و طول بدن لاروهای ماهی در هر حوضچه پس از بیهوشی در عصاره گل میخک (غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و کولیس ۰/۱ میلی متر اندازه گیری و برخی از معیارهای رشد تعیین شدند.

نرخ رشد ویژه (SGR)  $(SGR) = \frac{LnWt_2 - LnWt_1}{t_2 - t_1} \times 100$  (۱۴)  
لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی (گرم)  $LnWt_2 =$  لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی  $LnWt_1 =$  طول دوره آزمایش (روز)  $t_2 - t_1 =$  ضریب تبدیل غذایی (FCR)،  $FCR = g \text{ dry feed eaten} / g \text{ live weight gain}$  (۷)، غذای خورده شده (گرم)  $g \text{ feed eaten} =$  وزن بدست آمده  $gain = Dry \text{ feed eaten} \times 100$  (۷)، (FE)، کارایی تبدیل غذا  $FE = g \text{ Live weight gain} / g \text{ feed eaten}$ ، وزن بدست آمده ماهی (گرم)  $gain = g \text{ live weight} / g \text{ feed eaten}$  (گرم)  $g \text{ live weight} =$  غذای خشک خورده شده (گرم)  $g \text{ feed eaten} =$  ضریب رشد حرارتی (TGC)،  $(TGC) = \frac{\sum_{(day - degrees)}^{0C} 0.333 - BW1}{\sum_{(day - degrees)}^{0C} 0.333} \times 100$  (۷)،  $TGC \% = [BW2 - BW1] / \sum_{(day - degrees)}^{0C} 0.333$ ، وزن توده زنده ثانویه ماهی (گرم)  $BW2 =$  وزن توده زنده اولیه ماهی (گرم)  $BW1 =$  مجموع میانگین درجه حرارت های روزانه  $\sum_{(day - degrees)}^{0C} =$  نسبت کارایی پروتئین (PER)، (۱۴)  $PER = g \text{ live weight gain} / g \text{ protein gain}$ ، وزن بدست آمده (گرم)

کشت تریپتیک سوی براث، به صورت خالص کشت داده شدند (۲۵).

**مکمل سازی جیره ها:** جیره های آزمایشی در ۳ گروه (لاکتوباسیلوس ها، باسیلوس ها و باکتری های جدا شده از روده ماهیان خاویاری) و هر یک نیز در سه سطح با مخلوط های پروبیوتیکی مکمل سازی گردیدند. در گروه باسیلوس های تجاری، از فرآورده پودری آنها مقادیر ۲/۰ و ۲۰ میلی گرم برداشته و به طور جداگانه به ۳ ظرف شیشه ای حاوی ۳/۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. این سوسپانسیون های باکتریایی به ازا هر گرم از غذای بیومار (ساخت کشور فرانسه) اضافه شده و به صورت هموزن در آمدند. سرانجام ۳ جیره آزمایشی به ترتیب با غلظت  $2 \times 10^4$  (۴/۳۰) لگاریتم واحد کلنی،  $2 \times 10^5$  (۵/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، و  $2 \times 10^6$  (۶/۳۰) لگاریتم واحد کلنی، باکتری در هر گرم جیره تهیه شد. افزایش سطوح باکتریایی به ازا هر جیره معادل یک واحد لگاریتمی تعیین گردید. در گروه لاکتوباسیلوس ها نیز جیره های آزمایشی با همین غلظت های باکتریایی از طریق برداشت ۲/۰، ۲ و ۲ میلی گرم از فرآورده پودری آنها و مطابق با روش ذکر شده، پس از تهیه سوسپانسیون و مخلوط با جیره ها و هموزن سازی آنها تهیه گردید. در خصوص باسیلوس های ایزوله شده از روده ماهیان خاویاری، باکتری های جدا شده از روده، پس از انجام کشت خالص در محیط کشت تریپتیک سوی براث (۹)،  $10^9$  میلیتر از آن برداشته و در دستگاه سانتریفیوژ با دور rpm ۵۰۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شده و سپس از عصاره بدست آمده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل شیماتزو UV-160)، در طول موج ۶۱۰ نانومتر، غلظت های نوری  $4/30$  لگاریتم واحد کلنی،  $5/30$  لگاریتم واحد کلنی و  $6/30$  لگاریتم واحد کلنی در هر میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید (۱۲). این سه غلظت باکتری تهیه شده از مخلوط دو باکتری ایزوله شده از ماهیان خاویاری، مطابق با روش ذکر شده به جیره ها افزوده و مکمل سازی گردیدند. جیره ها پس از یک نواخت شدن، در انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد (۱۰) در مدت ۵ ساعت خشک شد (۱۰ درصد رطوبت) و مطابق با نیاز لاروهای ماهی از الک های ریز چشمه (۰/۱ میلیمتری) عبور داده و در اختیار آنها قرار گرفت. جیره لاروهای ماهی در شاهد با همین فرآیند ساخته شد، ولی به آنها هیچ گونه باسیلوس پروبیوتیکی اضافه نگردید.

**طرح آزمایش:** جهت این آزمایش ۹ تیمار آزمایشی به همراه یک تیمار شاهد در نظر گرفته شد. لاروهای ماهی قزل آلا رنگین کمان از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی مهندس ضمیری (واقع در شهر علی آباد کتول) تهیه و توسط تانکر فلزی و تحت شرایط اکسیژن رسانی، به آزمایشگاه هیدرو بیولوژی مجتمع آموزش عالی گنبد کاووس منتقل گردیدند. تعداد ۴۰ تشتک فایبرگلاس گرد با حجم آبگیری ۱۲ لیتر در آزمایشگاه جایابی شدند. یک هفته پس از آداپتاسیون لاروها، همزمان با اتمام جذب کیسه زرد (وزن  $85 \pm 4$  میلی گرم) به تعداد ۵۰ قطعه به هر یک از حوضچه ها معرفی گردیدند. تیمارهای آزمایشی در ۳ گروه و هر یک با ۳ سطح در نظر گرفته



جدول ۱- معیارهای رشد لارو ماهی قزل آلائی تغذیه شده از جیره‌های آزمایشی مکمل شده با ۳ مخلوط پروبیوتیکی. حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانه معنی دار بودن می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

معیارهای رشد تیمار (لارو قزل آلا)	وزن نهایی لارو قزل آلا (گرم)	ضریب تبدیل غذایی (FCR)	کارایی تبدیل غذا (FE %)	ضریب رشد حرارتی (TGC%)	نرخ رشد ویژه (SGR %)
شاهد (جیره مکمل نشده با پروبیوتیکهای باکتریایی)	۱/۵۶±۰/۳۵ <sup>C</sup>	۱/۰۳±۰/۲۹ <sup>AB</sup>	۱۰۳/۲۸±۲۳/۶۳ <sup>D</sup>	۳/۲۵±۰/۳۹ <sup>C</sup>	۴/۲۴±۰/۷۳ <sup>B</sup>
L <sup>۱</sup> (۴/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۶۷±۰/۵۰ <sup>A</sup>	۱/۰۹±۰/۳۴ <sup>ABC</sup>	۱۱۰/۷۴±۳۳/۴۵ <sup>ABC</sup>	۳/۳۴±۰/۴۴ <sup>BC</sup>	۴/۴۲±۰/۸۹ <sup>AB</sup>
L <sup>۲</sup> (۵/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۶۵±۰/۴۰ <sup>ABC</sup>	۰/۹۷±۰/۲۶ <sup>ABC</sup>	۱۰۹/۳۳±۳۶/۵۸ <sup>ABCD</sup>	۳/۳۴±۰/۳۶ <sup>BC</sup>	۴/۴۱±۰/۷۷ <sup>AB</sup>
L <sup>۳</sup> (۶/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۷۱±۰/۳۵ <sup>A</sup>	۰/۹۲±۰/۳۰ <sup>C</sup>	۱۱۳/۳۵±۲۳/۵۷ <sup>B</sup>	۳/۴۰±۰/۳۲ <sup>AB</sup>	۴/۵۵±۰/۶۶ <sup>A</sup>
B <sup>۱</sup> (۴/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۶۷±۰/۴۴ <sup>AB</sup>	۱/۰۰±۰/۴۵ <sup>AB</sup>	۱۱۰/۵۳±۲۹/۴۸ <sup>ABC</sup>	۳/۳۳±۰/۵۱ <sup>BC</sup>	۴/۴۰±۰/۹۸ <sup>AB</sup>
B <sup>۲</sup> (۵/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۶۹±۰/۴۷ <sup>A</sup>	۱/۰۹±۰/۳۷ <sup>ABC</sup>	۱۱۱/۵۴±۳۱/۵۹ <sup>B</sup>	۳/۳۵±۰/۴۶ <sup>BC</sup>	۴/۴۳±۰/۹۵ <sup>AB</sup>
B <sup>۳</sup> (۶/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۵۸±۰/۴۱ <sup>BC</sup>	۱/۰۳±۰/۳۲ <sup>A</sup>	۱۰۴/۲۱±۲۷/۳۳ <sup>CD</sup>	۳/۲۵±۰/۴۰ <sup>C</sup>	۴/۲۵±۰/۸۴ <sup>B</sup>
A <sup>۱</sup> (۴/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۷۵±۰/۴۰ <sup>A</sup>	۱/۰۹±۰/۳۳ <sup>C</sup>	۱۱۶/۰۸±۲۵/۵۶ <sup>A</sup>	۳/۴۴±۰/۳۲ <sup>A</sup>	۴/۶۱±۰/۷۷ <sup>A</sup>
A <sup>۲</sup> (۵/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۷۴±۰/۴۸ <sup>A</sup>	۱/۰۹±۰/۳۳ <sup>BC</sup>	۱۱۳/۸۰±۲۷/۰۹ <sup>B</sup>	۳/۳۹±۰/۴۲ <sup>AB</sup>	۴/۵۳±۰/۸۵ <sup>A</sup>
A <sup>۳</sup> (۶/۳۰ Log CFU / گرم)	۱/۶۴±۰/۳۹ <sup>ABC</sup>	۱/۰۹±۰/۲۸ <sup>ABC</sup>	۱۰۸/۸۵±۲۵/۹۴ <sup>BCD</sup>	۳/۳۳±۰/۳۷ <sup>BC</sup>	۴/۴۰±۰/۷۷ <sup>AB</sup>

آزمایش مقابله با شوک‌های حرارتی (۳۳ درجه سانتی‌گراد)، شوری (۴۰ گرم در لیتر)، قلیائیت (pH=۱۲) و اسیدیته (pH=۲) قرار گرفتند. با استفاده از بخاری الکتریکی مدرج، دمای مورد نظر تنظیم گردید. محلول شوری نیز با استفاده از ۴۰ گرم در لیتر نمک تهیه شد. محلول‌های قلیایی و اسیدی با استفاده از سود (NaOH) و اسید کلریدر یک غلیظ تهیه شده و با استفاده از دستگاه‌های شوری سنج و پی-اچ متر مدل هاناسنجش و کنترل گردیدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده در ارتباط با معیارهای رشد و آزمایش‌های مقابله با استرس، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

## نتایج

نتایج تأثیر پروبیوتیک‌ها بر پارامترهای رشد لاروهای ماهی قزل آلائی رنگین‌کمان در جدول آورده شده است. در ارتباط با وزن نهایی لاروهای ماهی، نتایج بهتری در تیمارهای A<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub> و L<sub>۲</sub> مشاهده گردید که در مقایسه

g live weight، پروتئین خورده شده (گرم) = g Protein intake، نسبت کارایی چربی (LER)، (۱۴) = g live weight gain / g lipid intake، چربی خورد شده LER، وزن بدست آمده (گرم) = g live weight gain، چربی خورد شده (گرم) = g Lipid intake.

**معیارهای کیفی آب:** در طول دوره آزمایش با استفاده از هواده الکتریکی (مدل هایلا)، اکسیژن محلول در سطح ۷/۵±۰/۶۵ میلی گرم در لیتر نگهداری گردید. اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه اکسیژن سنج، پی-اچ آب با استفاده از دستگاه واترچکر مدل هانا روزانه اندازه گیری گردید. مقادیر فسفات (PO<sub>4</sub>)، سولفات (SO<sub>4</sub>)، نیتريت (NO<sub>2</sub>) و نیترات (NO<sub>3</sub>) در هر هفته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل حک انجام گردید. همچنین اندازه‌گیری درجه حرارت آب نیز در هر روز هنگام صبح و عصر انجام گرفت.

**سنجش مقاومت لاروهای ماهی:** در انتهای دوره آزمایش (۳۲ روز) به منظور بررسی میزان مقاومت نوزادهای ماهی قزل آلائی رنگین‌کمان تغذیه شده با هر یک از جیره‌های مورد آزمون، تعداد ۳۰ قطعه از هر حوضچه نمونه برداری شده و با تراکم ۴ قطعه در هر لیتر، به طور مجزا تحت



جدول ۲- تغییرات مدت زمان بقاء لارو ماهی قزل آلا تغذیه شده از جیره های آزمایشی در مقابله با استرس های مختلف. حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانه معنی دار بودن می باشد ( $p < 0.05$ ).

تیمار (لارو قزل آلا)	استرس	استرس حرارتی (C U) (ثانیه)	استرس شوری (۴۰ گرم در لیتر) (ثانیه)	استرس پی-اچ اسیدی (pH=۲) (ثانیه)	استرس پی-اچ قلیایی (pH=۱۲) (ثانیه)
شاهد (جیره مکمل نشده با پروبیوتیکهای باکتریایی)		۶۲/۶۷±۹/۳۹ <sup>B</sup>	۱۹۵۰/۶۶±۱۸/۷۷ <sup>A</sup>	۲۵۱/۰۰±۴۸/۸۹ <sup>F</sup>	۱۶۰/۰۰±۱۷/۴۴ <sup>D</sup>
L <sup>۱</sup> (گرم / ۴/۳۰ Log CFU)		۷۰/۳۳±۸/۵۰ <sup>B</sup>	۱۹۸۱/۶۷±۴۳۱/۵۲ <sup>A</sup>	۲۸۶/۰۰±۶/۰۰ <sup>E</sup>	۱۹۸/۳۳±۲۰/۲۰ <sup>C</sup>
L <sup>۲</sup> (گرم / ۵/۳۰ Log CFU)		۷۶/۶۷±۱۰/۱۱ <sup>AB</sup>	۱۹۵۵/۶۷±۲۷۷/۷۴ <sup>A</sup>	۳۰۲/۶۷±۱۶/۱۷ <sup>DE</sup>	۲۱۲/۶۷±۱۶/۲۸ <sup>BC</sup>
L <sup>۳</sup> (گرم / ۶/۳۰ Log CFU)		۷۰/۰۰±۳/۰۰ <sup>B</sup>	۱۸۲۶/۰۰±۲۱۲/۴۲ <sup>A</sup>	۳۱۰/۰۰±۳/۶۰ <sup>DE</sup>	۲۱۲/۶۷±۱۶/۲۸ <sup>BC</sup>
B <sup>۱</sup> (گرم / ۴/۳۰ Log CFU)		۹۴/۳۳±۲۸/۲۹ <sup>A</sup>	۲۰۱۴/۰۰±۳۴۰/۸۰ <sup>A</sup>	۳۳۱/۳۳±۷/۰۹ <sup>CD</sup>	۲۲۳/۶۷±۱۴/۵۷ <sup>BC</sup>
B <sup>۲</sup> (گرم / ۵/۳۰ Log CFU)		۷۰/۰۰±۴/۳۵ <sup>B</sup>	۲۰۴۰/۶۷±۱۸۶/۸۰ <sup>A</sup>	۳۱۴/۰۰±۳۲/۸۰ <sup>DE</sup>	۲۲۶/۶۷±۱۶/۶۷ <sup>BC</sup>
B <sup>۳</sup> (گرم / ۶/۳۰ Log CFU)		۷۸/۳۳±۱۲/۸۵ <sup>AB</sup>	۲۰۱۹/۰۰±۱۷۰/۰۰ <sup>A</sup>	۳۵۸/۰۰±۲۸/۰۰ <sup>ABC</sup>	۲۴۹/۰۰±۱۰/۸۱ <sup>AB</sup>
A <sup>۱</sup> (گرم / ۴/۳۰ Log CFU)		۷۷/۶۷±۴/۰۱ <sup>AB</sup>	۱۸۸۹/۳۳±۱۷۴/۸۱ <sup>A</sup>	۳۷۴/۰۰±۲۰/۰۰ <sup>A</sup>	۲۷۵/۶۷±۵۷/۷۴ <sup>A</sup>
A <sup>۲</sup> (گرم / ۵/۳۰ Log CFU)		۸۲/۰۰±۶/۰۸ <sup>AB</sup>	۱۸۲۹/۳۳±۲۱۵/۵۰ <sup>A</sup>	۳۳۷/۰۰±۲۸/۱۶ <sup>BCD</sup>	۲۲۰/۶۷±۱۶/۹۲ <sup>BC</sup>
A <sup>۳</sup> (گرم / ۶/۳۰ Log CFU)		۷۲/۳۳±۶/۰۵ <sup>AB</sup>	۱۹۶۵/۶۷±۱۹۲/۸۱ <sup>A</sup>	۳۷۱/۳۳±۲۰/۴۳ <sup>AB</sup>	۲۳۸/۳۳±۱۴/۰۵ <sup>ABC</sup>

درصد) برخی از تیمارهای آزمایشی از افزایش بسیار خوبی برخوردار بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی دار نشان داد ( $p > 0.05$ ). همچنین بالاترین متوسط آن در تیمار A<sub>۱</sub> (۳/۴۴±۰/۳۲ درصد) و کمترین متوسط آن در شاهد و B<sub>۳</sub> (۳/۲۵±۰/۳۹ درصد) محاسبه گردید. بین تیمارهای B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub>، L<sub>۱</sub>، L<sub>۲</sub>، L<sub>۳</sub> و A<sub>۱</sub> در ارتباط با این پارامتر رشد اختلاف معنی داری بدست نیامد ( $p > 0.05$ ). نرخ رشد ویژه (SGR) درصد) در لارو ماهیان قزل آلا با حضور باکتری های زیست یار در برخی از تیمارها به خوبی ارتقاء یافت. بالاترین عملکرد نرخ رشد ویژه در لاروهای ماهی تغذیه شده از جیره های مکملی با باسیلوس های ایزوله شده از روده ماهیان خاویاری در سطوح ۴/۳۰ و ۵/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در گرم مربوط به تیمارهای A<sub>۱</sub> و A<sub>۲</sub> و همچنین لاروهای ماهی تغذیه شده از جیره مکمل شده با لاکتوباسیلوس های زیست یار در سطح ۶/۳۰ لگاریتم باکتری در گرم (تیمار L<sub>۳</sub>) بدست آمد و با شاهد اختلاف معنی دار نشان دادند ( $p > 0.05$ ). سطوح مقاومت لاروهای ماهی قزل آلا در مقابله با این استرس ها، با یکدیگر متفاوت بود و تقریباً در تمامی تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر زیست یارها، به طور معنی دار بیشتر از شاهد بودند ( $p > 0.05$ ).

با شاهد و دیگر تیمارهای آزمایشی در سطح بالاتری قرار داشتند و اختلاف معنی داری نیز با آنها نشان دادند ( $p < 0.05$ ). کمترین متوسط وزن بدست آمده در شاهد (۱/۷۵±۰/۳۵ گرم) و بیشترین متوسط وزن لارو ماهی (۱/۷۵±۰/۴۰ گرم) در تیمار A<sub>۱</sub> (لاروهای تغذیه شده از جیره مکمل شده با باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان خاویاری با غلظت ۴/۳۱ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم) بود.

ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمارهای آزمایشی کاهش یافت و در تیمارهای A<sub>۱</sub> (۰/۹۲±۰/۳۳) و L<sub>۳</sub> (۰/۹۲±۰/۲۰) نتایج بهتری حاصل گردید و اختلاف معنی داری با شاهد و تیمارهای B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub> بدست آمد ( $p < 0.05$ ), بیشترین مقدار آن در تیمار B<sub>۳</sub> (۱/۰۳±۰/۳۲) و شاهد (۱/۰۳±۰/۳۲) تعیین گردید. تیمارهای L<sub>۱</sub>، L<sub>۲</sub>، B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub> و A<sub>۳</sub> با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). همچنین کارایی تغذیه (FE) درصد) در تیمار آزمایشی A<sub>۱</sub> (۱۱۶/۰۸±۲۵/۵۶ درصد) در بالاترین سطح قرار داشت و با تیمار شاهد و تیمارهای A<sub>۱</sub>، A<sub>۲</sub>، B<sub>۱</sub>، B<sub>۲</sub> و L<sub>۳</sub> اختلاف معنی داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). پائین ترین سطح این پارامتر در تیمار شاهد (۱۰۳/۲۸±۲۳/۶۳) درصد بدست آمد. ضریب رشد حرارتی (TGC)



(*Bacillus sp*) با باسیلوس پروبیوتیکی لیوفلیزه (*Cyprinus carpio*) به دست آوردند، به طوری که ضریب تبدیل غذایی نیز به طور معنی دار از ۲/۴۶ به ۲/۱۱ کاهش یافت. Bagheri و همکاران در سال ۲۰۰۸، حد اقل ضریب تبدیل غذایی (۰/۹) را در لاروهای قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با جیره های مکمل شده با باسیلوس سابتیلیس و لیکنی فورمیس در سطح  $3/8 \times 10^9$  باکتری در هر گرم غذا بدست آوردند.

در این تحقیق وزن نهایی لاروهای ماهی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد افزایش یافت و با آن اختلاف معنی دار نشان داد. بهترین نتیجه از طریق مکمل سازی جیره ها با باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان خاویاری و در غلظت ۴/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم جیره حاصل گردید. همسوی با این نتایج، Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۱۱) تائید نمودند که باسیلوس سیرکولانس ایزوله شده از روده ماهی رو هو (*Labeo rohita*) در سطحی معادل گرم غذا/  $2 \times 10^8$  CFU، وزن بچه ماهیان را از ۳/۴۵ به ۴/۶۱ گرم رسانید. همسوی با این نتایج Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که باسیلوس های جدا شده از روده ماهی رو هو در مقایسه با باسیلوس های تجاری، تأثیر بالایی در افزایش وزن لاروهای این ماهی دارند (۹).

باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان خاویاری در مقایسه با باسیلوس ها و لاکتوباسیلوس های تجاری در افزایش نرخ رشد و ویژه از عملکرد بهتری برخوردار بودند، بهترین میزان نرخ رشد ویژه در تیمار  $A_1$  بدست آمد. همچنین لاکتوباسیلوس های تجاری مکمل شده در سطحی معادل ۶/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم، در مقایسه با باسیلوس های تجاری، از عملکرد بهتری برخوردار بودند. نتایج مشابهی توسط Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مکمل سازی جیره های مورد تغذیه لارو ماهی رو هو در نرخی معادل گرم غذا/  $10^8$  CFU، بدست آمد، به طوری که نرخ رشد ویژه از ۱۰/۸۹ به ۱۷/۷۹ ارتقاء یافت. همسوی با نتایج تحقیق حاضر، Jafaryan و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که نرخ رشد ویژه لاروهای ماهی قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده از جیره های مکمل شده با غلظت  $4 \times 10^7$  اسپور باسیلوس لیسنی فورمیس و باسیلوس لتروسپروس (*B. laterosporus*) در هر گرم غذا، از ۵/۸۴ به ۶/۴۱ درصد وزن بدن در روز افزایش یافت (۲۱). در همین خصوص Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ عنوان کردند که باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان پرورشی عملکرد بهتری را در مقایسه با باسیلوس های تجاری دارند.

پروبیوتیک در این تحقیق، ضریب رشد حرارتی را در برخی از تیمارهای آزمایشی افزایش دادند. بهترین نتیجه از طریق باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان خاویاری و در غلظت مکمل سازی ۴/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم جیره حاصل گردید. در حالی که باسیلوس ها و لاکتوباسیلوس های تجاری در مقایسه با تیمار شاهد، به طور معنی داری موجب افزایش این پارامتر رشد نگردیدند. در همین خصوص Balcazar و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که تفاوت عملکرد باکتری های

در ارتباط با استرس شوری هیچ اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر و شاهد مشاهده نگردید ( $p > 0/05$ ). همچنین مقاومت لاروهای ماهی در تیمارهای مختلف نسبت به استرس پی - اچ اسیدی در مقایسه با پی - اچ بازی بیشتر بود (جدول ۲). سرعت تلفات لاروهای ماهی قزل آلا تیمار شاهد، در مقابله با استرس حرارت در بالاترین مقدار بود و از کمترین متوسط زمان بقاء (۶۲/۶۷±۹/۳۹) ثانیه برخوردار بودند. در حالی که بالاترین میزان زمان بقاء لاروهای ماهی (بیشترین متوسط مقاومت) در تیمار  $B_1$  (تغذیه شده از جیره های مکمل شده با باسیلوس های زیست یار تجاری به میزان ۴/۳۰ لگاریتم واحد کلنی در هر گرم جیره) معادل ۹۴/۳۳±۲۸/۲۹ ثانیه بدست آمد و با شاهد و تیمارهای  $L_1$ ،  $L_3$  و  $B_3$  نیز اختلاف معنی دار نشان داد ( $p > 0/05$ ). بالاترین میزان زمان بقاء لاروهای ماهی در مقابله با استرس پی - اچ اسیدی ( $pH=2$ )، در تیمار  $A_1$  (۳۷۴±۲۰/۲۰) ثانیه بدست آمد و کمترین متوسط آن در تیمار شاهد (۲۵۱±۴۸/۸۹) تعیین گردید. تمامی تیمارهای تحت تاثیر باکتری ها با شاهد اختلاف معنی دار داشتند ( $p > 0/05$ ). نتایج آزمایش های مقابله با استرس پی - اچ قلبیایی ( $pH=12$ ) نیز نشان داد که بیشترین متوسط زمان زنده ماندن لاروهای ماهی قزل آلا در تیمار  $A_1$  مشاهده گردید و با تیمارهای شاهد  $L_1$ ،  $L_3$ ،  $B_1$ ،  $B_3$  و  $A_3$  اختلاف معنی داری را نشان داد ( $p > 0/05$ ). سنجش پارامترهای فیزیوشیمیایی آب ورودی به حوضچه های پرورشی لاروهای ماهی قزل آلا، در مرحله پرورش ۳۲ روزه انجام پذیرفت و مقادیر اکسیژن:  $7/75 \pm 0/32$  میلی گرم در لیتر، دما:  $19/37 \pm 0/35$  درجه سانتیگراد، اسیدیته:  $7/31 \pm 0/18$ ، فسفات:  $0/36 \pm 0/08$  میلی گرم بر لیتر، سولفات:  $110/4 \pm 15/4$  میلی گرم بر لیتر، نیتریت:  $0/013 \pm 0/001$  و نیترات:  $15/84 \pm 0/2$  میلی گرم بر لیتر در طول دوره آزمایش ثبت گردید.

## بحث

تأثیر باکتری های زیست یار تجاری در خصوص ارتقاء معیارهای رشد و افزایش بقاء در ماهیان پرورشی، در تحقیق های زیادی به اثبات رسیده است (۵، ۲۳). در بین زیست یارهای بکار گرفته شده در این آزمایش، باسیلوس های جدا شده از روده ماهیان خاویاری از عملکرد رشد بهتری برخوردار بودند. ضریب تبدیل غذایی (FCR) که یکی از مهم ترین شاخص های تغذیه ای است با بکارگیری باکتری های زیست یار بطور قابل توجهی در تیمارهای آزمایشی کاهش یافت و نتایج بهتر آن در تیمارهای  $A_1$  ( $0/92 \pm 0/33$ ) و  $L_3$  ( $0/92 \pm 0/20$ ) مشاهده گردید. در همین راستا Jafaryan و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که بکارگیری مخلوط باسیلوس های پروبیوتیکی تجاری در جیره های آزمایشی لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان میزان ضریب تبدیل غذایی را از ۱/۷۴ به ۱/۵۹ کاهش داد (۱۸). همچنین در تائید یافته های این تحقیق، نتایج مشابهی را Zirong و Yanbo در سال ۲۰۰۶ در مکمل سازی جیره ماهی کپور معمولی



## References

- Ahilan, B., Shine, G., Santhanam. R. (2004) Influence of probiotics on the growth and gut microflora load of juvenile Gold fish (*Carassius auratus*). Asian.Fish. Sci. 171: 271-278.
- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizadeh, M., Farzanfar, A. (2008) Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout fry given diet supplemented with probiotic during the two month of first feeding. Turkish J. Fish. Aqua. Sci. 8:43-48.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, k., Sen, S.K. Ray, A.K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aqua. Int. 10 : 109-121.
- Balcazar, J. L., Balas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Marques, I., Girons, O., Muzquiz, L. (2007) Changes in intestinal microbiota and immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). Br. J. Nutr. 97: 522-527.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Bukvic, Z., Brkic, S. Zimmer, R. (1998) Influence of probiotic *Streptococcus faecium* on growth and content of intestinal microflora in *Cyprinus carpio*. Czech J. Anim. Sci. 8: 231-235.
- Carnevali, O., Zamponi, M. C., Sulpizio, P., Rollo, A. Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A. M., Cresci, A. (2004) Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aqua. Int. 12:377-386.
- De Silva, S.S., Anderson, T.A. (1995). The effect of ration on growth ratio. In: Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman, London. UK. p:319.
- Gatesoupe, F. J. (1999) Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180: 147 - 165.
- Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A. K. (2002a) Characterization of *Bacillus* Isolated from the gut of Rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. Appl. Aqua. 12: 33-42.
- Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A. K. (2002b) Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) spawn feed diets formulated with intestinal bacterium, *Bacillus circulans*. Acta. Ichthyo. Pistor. 32(2):83-92.

پروبیوتیکی به مواردی نظیر ژنتیک، تغذیه و فاکتورهای محیطی می تواند بستگی داشته باشد. همچنین Bairagi و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأیید کردند که فعالیت های لیپولیتیک، آمیلولیتیک و پروتئولیتیک باکتری های زیست یار موجب افزایش قابلیت هضم و جذب غذا در روده میزبان شده و در نتیجه معیارهای رشد و تغذیه ارتقاء می یابد.

باسیلوس های زیست یار در آزمایش مقابله با استرس ها، مقاومت لاروهای ماهی را در تحمل استرس ها بالا برده و طول مدت زنده ماندن آنها افزایش دادند. در حالی که در شوک شوری، نتایج معنی داری در زمان زنده ماندن لاروهای ماهی بدست نیامد. در استرس حرارتی تیمار B1 نتوانست تفاوت معنی داری را با شاهد و دیگر تیمارها نشان دهد. در موافقت با این نتایج، باسیلوس *T. toyoi* (*Bacillus toyoi*) میزان بقاء لاروهای توربوت (*Scophthalmus maximus*) را در حد معنی دار افزایش داد (۸). همسوی با این نتایج، Carnevali و همکاران در سال ۲۰۰۴ در استفاده از لاکتوباسیلوس فروکتیورانس و لاکتوباسیلوس پلانناروم نتایج خوبی را در افزایش بقاء لارو شانک ماهی بدست آوردند. باسیلوس *S. sericolanus* بکار رفته در جیره ماهی روهو، درصد بقاء را از ۸۱/۶۶ به ۹۷/۳۳ درصد افزایش داد (۱۰). شواهدی وجود دارد که باکتری های زیست یار با تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش مقاومت در برابر استرس های محیطی گشته و درصد بقاء را بالا می برند (۱۶، ۲۲، ۲۴). نتایج مشابهی در بکارگیری باسیلوس های پروبیوتیکی در تغذیه لارو ماهی قزل آلا با دافنی فریز شده به دست آمد (۱۸).

این باکتری ها با تحریک سیستم ایمنی میزبان از طریق ترشح ترکیبات متابولیکی و افزایش فعالیت لیزوزیمی و ایمونوگلوبولین، پاسخ های ایمنی ماهی را در مقابل محرک های محیطی افزایش می دهند (۱۵). در تأیید یافته های این تحقیق، Balcazar و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که زیست یارهای لاکتوباسیلی موجب افزایش پاسخ های ایمنی ماهیان شده و نرخ بقاء بالاتری را به همراه دارند. این شواهد نشان می دهند زیست یارها در افزایش فعالیت سیستم ایمنی ماهیان و مقاومت سازی آنها در مقابل عوامل بیماری زا و محرک های محیطی تأثیر بسیار مثبتی را از خود نشان می دهند. در همین خصوص Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثبات نمودند که فعالیت لیزوزیمی سرم ماهی قزل آلا رنگین کمان با بکارگیری لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) افزایش یافت.

نتایج این تحقیق روشن ساخت که سطوح متفاوتی از زیست یارها، توانایی های مختلفی را در تأثیرگذاری بر عملکرد رشد و افزایش مقاومت لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان در مقابل محرک های استرس زای محیطی داشته و بر حسب غلظت های مختلف مورد استفاده، این تأثیر متغیر می باشد و در این میان باسیلوس های زیست یار جدا شده از روده ماهیان خاویاری به عنوان باکتری های زیست یار بومی در مقایسه با گونه های تجاری و یا غیر بومی از عملکرد بهتری برخوردار بودند.



11. Ghosh, k., S en, S.K., Ray, A. K. (2004) Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton,1822) spawn feed diets formented with intestine bacterium, *Bacillus circulans*. *Acta. Ichthyo. Pistor.* 34(2):155-165.
12. Gomez- Gil, B., Herrera- Vega, M. A., Aberu- Grobis, F.A., Roque, A. (1998) Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the Brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2318- 2322.
13. Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penneaus vannamei*. *Aquaculture.* 233:1-14.
14. Hevroy, E. M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, k., Rund, M. G.-I., Hemre. (2005) Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aqua. Nutri.* 11:301-313.
15. Irianto, A., Austin, B. (2002) Probiotic in aquaculture, *J. Fish. Dis.* 25: 1-10.
16. Irianto, A., Austin, B. (2003) A short communication: use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish. Dis.* 26:59-62.
17. Jafaryan, H., Takami, G. A., Kamali, A., Soltani, H., Habibirezaei, M. (2007) The use of probiotic bacillus bioencapsulated with *Artemia urmiana* nauplii for the growth and survival in *Acipenser persicus* larva. *J. Agri. Sci. Natur. Res.* 14: 87-97.
18. Jafaryan, H., Taati keley, M., Nazarpoor, A.R. (2009) The study effect of probioic bacillus on growth of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae via Supplementation with meal of *Daphnia magna*. *J. Agri. Sci. Natur. Res.* 16: 48-59.
19. Kapetanovic, D., Kurtovic, B., Teskeredzic, E. (2005) Difference in bacterial population in raibow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum) fry after transfer from incubator to pools. *FTB.* 48:189-193.
20. Kim, D. H., Austin, B. (2006) Innate immune responses in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* , Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shelfish. Immunol.* 21:513-524.
21. Makridis, P., Bergh, Q., Skjermoj, J., Vadstein, O. (2001) Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae . *Aqua. Int.* 9: 225- 235.
22. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. M. (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shelfish. Immunol.* 15: 443-452.
23. Noh, S.H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J. (1994) Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. *Korean J. Anim. Sci.* 36:480-486.
24. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. Sugita, H. (2004) Immune responses in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* JCM. 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol.* VII. 102: 379-388.
25. Peter, H., Sneath, A. (1986) Bergeys manual of systematic Bacteriology.
26. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitvorakul , S., Menasveta, p. (1998) Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth . *Aquaculture.* 167:301-313.
27. Yanbo, W., Zirong, X. (2006) Effect of probiotic for commom carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzymes activities. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 127: 283-292.
28. Ziaei-Nejad, S., Habibi Rezaei, M., Azari Takami, G., 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.





# THE COMPARISON OF PERFORMANCE OF ISOLATED STURGEON GUT BACILLUS (*ACIPENSER PERSICUS* AND *HUSO HUSO*) WITH COMMERCIAL MICROBIAL PRODUCTS ON GROWTH AND SURVIVAL OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKIS*) LARVAE

Jafaryan, H.<sup>1\*</sup>, Soltani, M.<sup>2</sup>, Taati, M.<sup>3</sup>, Nazarpour, A.<sup>4</sup>, Morovat, R.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of fisheries and aquatic, Gonbad Institutes of Higher Education, Gonbade kavooos-Iran.

<sup>2</sup>Department of aquatic animal health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan-Iran.

<sup>4</sup>Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Thehran, Karaj- Iran.

<sup>5</sup>Expert of Fishery, Gonbad Institutes of Higher Education, Gonbade kavooos-Iran.

(Received 18 January 2010 , Accepted 6 September 2010)

---

## Abstract:

The use of probiotic bacteria has been suggested as an important strategy to accomplish reproducible outputs through biocontrol in cultivation systems for marine fish larvae and crustaceans. The bacterial flora in the larval gut originates from bacteria associated with the eggs, the water in the rearing tanks, and the live food. This study was aimed to determine the effect of commercial and Autochthonous probiotics on growth parameters and survival rate of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Trout larvae ( $85 \pm 4$  mg) were fed diets of Biomar. The experimental diets were supplemented with three blends of probiotic bacteria including lactobacillus, commercial Bacillus and isolated sturgeon gut bacillus in three levels (4.30, 5.30 and 6.30 LogCFU/g of feed) and were fed by Rainbow trout (larvae in 9 experimental treatments. The control treatment was fed on nonsupplemented diet. The experiment was carried out in completely random design. At the end of the period the fishes were biometered and tested by thermal, salinity, alkalinity and acidity stress. The highest specific growth rate, thermal growth coefficient and feed conversion efficiency were found in treatment A1. The treatments A1, A2, B1, B2, L1 and L3 had significant difference with control ( $p < 0.05$ ). The better feed conversion ratio was obtained in treatment A1 and L3. In challenge test of thermal stress, maximum of survival time was obtained in treatment B1. The results of the challenge tests with stress of alkalinity and acidity indicated that the best survival time was in treatment A1 and total experimeal treatments had significant difference with control ( $p < 0.05$ ). No significant difference in salinity challenge test was observed between the treatments ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** probiotic bacteria, challenge test, survival time, rainbow trout larvae, specific growth rate.

\*Corresponding author's email: [Hojat.jafarian@gmail.com](mailto:Hojat.jafarian@gmail.com), Tel: 0172-2293401, Fax: 0172-2293401

