فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۴

بهبود شاخص‌های رشد، بازماندگی، فاکتورهای خونی- ایمنی و تراکم باکتریایی روده ماهی آزاد دریای مازندران (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1870) تحت تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک بتاپلاس

صفی‌اله عسگری‌فر[۱]، مسعود هدایتی‌فرد[۲]*، حسین خارا[۳]

تاریخ دریافت: آبان ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴

چکیده

به منظور بهبود شاخص‌های رشد، بازماندگی، فاکتورهای خونی و ایمنی هومورال و همچنین بررسی تغییرات جمعیت میکروبی روده، اثرات پروبیوتیک بتاپلاس (Beta-Plus) روی ماهی آزاد دریای مازندران مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۵۸۵ قطعه ماهی آزاد جوان با میانگین وزنی ۵±۱۰۵ گرم در ۱۵ حوضچه با تراکم ۳۹ قطعه در ۱۵۰۰ لیتر، به مدت ۳ ماه مورد پرورش و مطالعه قرار گرفت. از سطوح متفاوت پروبیوتیک بتاپلاس (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ کیلوگرم در هر تن خوراک) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. نتایج نشان داد با افزودن پروبیوتیک به خوراک، شاخص‌های رشد همچون وزن نهایی، درصد افزایش وزن، FCR و SGR به طور معنی‌داری بهبود یافت (P<۰/۰۵). همچنین ماهیان تیمار ۳ (میزان ۱/۵ کیلوگرم بتاپلاس در هر تن) نسبت به سایر گروه‌ها بهترین عملکرد را در روند پرورش ماهی آزاد دریای مازندران نشان دادند. از بین پارامترهای خونی، گلبول‌های سفید (WBC) تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵)، در حالی که پروبیوتیک موجب کاهش گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (HTC) شد (P<۰/۰۵). همچنین افزودن بتاپلاس به خوراک موجب افزایش جمعیت باکتریایی مفید در ماهیان شد (P<۰/۰۵) اما تغییری در میزان ایمونوگلوبین (IgM) دیده نشد (P>۰/۰۵). بنابراین مکمل بتاپلاس به عنوان یک محرک رشد مناسب در پرورش آزاد ماهیان دریای مازندران معرفی شد.

واژگان کلیدی: *بتاپلاس، پروبیوتیک، ماهی آزاد دریای مازندران*، Salmo trutta caspius.

۱- کارشناس ارشد شیلات، پردیس علوم و تحقیقات گیلان، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.
۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
* نویسنده مسئول: hedayati.m@qaemiau.ac.ir

مقدمه

دگرگونی ترکیبات میکروبی زنده روده ماهیان و به دنبال آن کاهش حمایت از میکروفلورهای روده ممکن است به بیماری‌زایی در روده منجر شود؛ بنابراین مدیریت فلور روده یک مبحث مهم در دستیابی به بازده غذایی مناسب، رشد حیوانات و سلامتی آن‌ها است. این مدیریت با انتخاب سویه‌های مفید و کنترل تعداد آن‌ها و همین طور به حداقل رساندن تعداد سویه‌های منفی با توانایی بیماری‌زایی، صورت می‌گیرد. در آبزی‌پروری هنگام مواجهه با تهدیدهای باکتریایی و ویروسی از استراتژی‌های مختلفی همانند درمان شیمیایی، ضدعفونی کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Subasinghe, 1997).

ایجاد مقاومت باکتریایی می‌تواند ژن‌های مقاوم آن‌ها را به سایر باکتری‌ها که هرگز در معرض آنتی‌بیوتیک نبوده‌اند نیز انتقال دهند (Verschuere et al., 1999). درمان شیمیایی با مواد ضدمیکروبی، ضدعفونی کننده و آفت‌کش، می‌تواند اثرات مشکل ایجاد شده را درمان کند نه علت آن را (Planas et al., 1999). در حال حاضر برای کنترل بیماری‌ها، استراتژی‌های جایگزین متعددی برای آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد شده است. یکی از پراهمیت‌ترین تکنولوژی‌هایی که در پاسخ به مسئله کنترل بیماری‌ها توسعه یافته است استفاده از مکمل‌های زیستی مانند پروبیوتیک‌ها است. تعادل جیره غذایی موجود برای ماهیان، بر اساس تأمین نیازهای اساسی که برای انجام متابولیسم لازم است، بنا نهاده شده است (Gomez-Gil et al., 2000).

از میان خانواده آزادماهیان[1]، ماهی آزاد دریای مازندران (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) با نام صحیح «قزل‌آلای قهوه‌ای» اهمیت ویژه‌ای دارد و حفاظت و پرورش این ماهی از لحاظ کیفیت گوشت، ارزش اقتصادی و همچنین حفظ ذخیره ژنتیکی برای ایران ارزشمند است. از بین خانواده آزادماهیان، گونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان، قزل‌آلای خال‌قرمز، آزادماهی دریای مازندران و میزان محدودی ماهی آزاد زیبا (*Stenodus leucichthys*) و ماهی آزاد کتا[2] (*Oncorhynchus keta*) در آب‌های ایران یافت می‌شوند (Hedayatifard and Ramezani, 2007). ماهی آزاد دریای مازندران از جمله ماهیان مهاجر و با ارزش

1- Salmonidae
2- Chum Salmon

دریای مازندران است که در فصل پائیز و بهار جهت تخم‌ریزی وارد رودخانه‌های حوزه جنوبی این دریا می‌شود و در مناطق کوهستانی رودخانه‌هایی که دارای بستر قلوه سنگی، شنی و ماسه‌ای هستند به تخم‌ریزی می‌کنند (Kazanchiev, 1981; Nelson, 2006). بدن این ماهی نقره‌ای است و در پهلوها خال های ستاره‌ای دیده می‌شود. باله پشتی و مخرجی دارای خال‌های رنگی است. تعداد فلس آن بین باله چربی و خط جانبی ۱۱ تا ۱۹ عدد (Abdoli and Naderi, 2009) و در خط جانبی ۱۱۷ تا ۱۳۲ عدد فلس است (Kazanchiev, 1981). طول متوسط این ماهی حدود ۷۷ سانتی متر و وزن آن حدود ۴۸۰۰ گرم است (Abdoli and Naderi, 2009). ماهی آزاد دریای مازندران از جمله ماهیان مهاجر است که در دریا زندگی و تغذیه می‌کند. این ماهی در سواحل غربی و جنوبی دریا پراکنده است ولی در سواحل شمالی و همچنین سواحل شرقی نیز به ندرت مشاهده می‌شود (Kazanchiev, 1981).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای جلوگیری از بیماری‌ها و بهبود رشد می‌تواند منجر به تکامل تدریجی سویه‌های باکتریایی مقاوم شود (Weston, 1996; Esiobu et al., 2002). ثابت شده است که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها سیستم ایمنی را سرکوب می‌کنند و موجودات آبزی را بیش‌تر مستعد پذیرش بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و انگلی می‌کنند.

کاربرد پروبیوتیک‌ها، به عنوان یکی از راهکارهای افزایش تولید آزادماهیان، از پتانسیل بالایی برخوردار است. قرن‌ها است که پروبیوتیک‌های میکروبی به عنوان مکمل‌های غذایی در جانوران خشکی، برای بهبود سلامتی استفاده می‌شوند، بی آن که نحوه دقیق عمل آن‌ها شناخته شده باشد. اخیراً امکان استفاده از گروه‌های باکتریایی مثل *Bacillus* spp. به عنوان پروبیوتیک در موجودات آبزی شناخته شده است و به طور فزاینده‌ای در روش باکتریوتراپی خوراکی مورد بهره‌برداری قرار می گیرند.

پروبیوتیک تجاری بتاپلاس[1] (Biochem، آلمان) شامل دو گونه باکتری باسیلوس با گونه‌های *B. subtilis* و *B. licheniformis* با نسبت ۱:۱ و ویتامین بتائین[2] است. اثرات مفید استفاده از پروبیوتیک بتاپلاس در برخی جانوران از جمله پستانداران و پرندگان (مانند خوک و جوجه گوشتی) گزارش شده است اما

1- Beta Plus
2- Betain

اثرات آن در آبزی‌پروری ناشناخته است. باکتری‌های جنس باسیلوس علاوه بر اهمیت اقتصادی و تجاری، در زمینه پژوهش‌های علوم پایه، تولید بسیاری از پروتئین‌ها، تولید تعداد زیادی از آنزیم‌های صنعتی، مواد شوینده و تولید آنزیم‌هایی نظیر سابتیلیسین[1]، سلولاز[2] و آمیلاز[3] و نیز در صنعت داروسازی و تولید برخی آنتی‌بیوتیک‌ها کاربرد زیادی دارند (Kreuzer, 1994).

در مطالعه کنونی با متعادل کردن اجزاء اصلی جیره غذایی رایج این گونه و تکمیل آن با پروبیوتیک بتاپلاس، اثرات آن بر شاخص‌های رشد، بازماندگی، فاکتورهای خونی و ایمنی هومورال و همچنین تغییرات جمعیت میکروبی روده ماهی آزاد دریای مازندران مورد بررسی قرار گرفته، دز مناسب کاربردی این پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در زمستان سال ۱۳۹۲ به مدت سه ماه در کارگاه پرورش ماهی قزل‌آلای «شلفین سوادکوه» (منطقه ارات‌بن، سوادکوه، مازندران) انجام شد. از این رو، تعداد ۵۸۵ قطعه ماهی آزاد جوان در ۱۵ حوضچه با حجم آب حدود ۱۵۰۰ لیتر با تراکم ۳۹ عدد در هر حوضچه با میانگین وزنی ۵± ۱۰۵ گرم همراه با تعویض دائمی آب مورد پرورش قرار گرفتند. جهت کاهش استرس، به مدت ۴۸ ساعت غذادهی قطع شد. سپس برای آماده‌سازی، ماهیان به مدت ۲ هفته با خوراک فاقد پروبیوتیک تغذیه شدند. طرح کلی این پژوهش به مدت سه ماه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ سطح متفاوت پروبیوتیک بتاپلاس (Biochem، آلمان) شامل صفر (تیمار شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ کیلوگرم پروبیوتیک بتاپلاس در هر تن خوراک (Kg/T) با ۳ تکرار، انجام شد. پروبیوتیک بتاپلاس متشکل از *Bacillus licheniformis* (DSM 5749)، *Bacillus subtilis* (DSM 5750) و بتائین است.

تغذیه ماهیان

آزادماهیان جوان طی دوره تیمار با خوراک دان مرحله رشد (GFT2[4]؛ شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران) تغذیه شدند. ترکیب تقریبی خوراک، پلت ۴/۵ میلی‌متری حاوی ٪۳۸ پروتئین، ٪۱۶ چربی، ٪۱۰ مواد معدنی، ٪۴

1- Subtilisin
2- Cellulase
3- Amylase
4- Growth Food Trout-Stage 2

فیبر، ٪۱ فسفر و ٪۹ رطوبت بود. میزان کل غذای مورد نیاز بر اساس زیست‌سنجی آزادماهیان، مطابق جدول استاندارد (Farzanfar, 2005) روزانه ٪۱/۵ میانگین وزن بدن و با در نظر گرفتن میانگین دمای آب برای سه نوبت غذادهی در روز (ساعت‌های ۷، ۱۲ و ۱۷) محاسبه (رابطه ۱) و انجام شد (Timmons et al., 2001):

رابطه ۱: دفعات غذادهی روزانه

$$\text{تناوب غذادهی روزانه (ساعت)} = ۴۰ \times \frac{\sqrt{W}}{T^{1.1}}$$

W: وزن بدن (گرم)؛ T: دما (درجه سانتی‌گراد).

برای آماده‌سازی تیمارهای غذایی، پس از محاسبه، طبق توصیه شرکت تولید کننده (Biochem، آلمان) پروبیوتیک ابتدا توسط Mixer (مولینکس) آسیاب شده، از الک ۱۰۰ میکرون عبور داده شد. میزان پروبیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار با ترازوی حساس (AB204-N، Metler، آمریکا) در پلیت وزن شد. سپس مطابق روش مورد استفاده توسط Chang و Liu (۲۰۰۲)، با افزودن ۳ سی‌سی آب مقطر، محلول به دست آمده وزن (با ترازو PAND مدل EK-300i) و مخلوط شد. به ماهیان حوضچه‌های شاهد (گروه ۵) صرفاً خوراک دان مخلوط همراه با آب مقطر خورانده شد. کلیه خوراک‌های تهیه شده حدود یک ساعت در معرض جریان هوا قرار داده شد تا آب مخلوط شده با غذا، تبخیر شود. پس از آن، خوراک‌ها مجدداً وزن شدند تا به وزن اولیه برسند؛ سپس روغن مایع با نسبت مشخص و یکسانی روی همه آن‌ها اسپری شد و نهایتاً برای غذادهی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱: تیماربندی اثر پروبیوتیک بتاپلاس روی ماهیان آزاد دریای مازندران

شماره تیمار	شرح تیمار
۱	خوراک استاندارد GFT2 به همراه مکمل غذایی بتاپلاس به نسبت ٪۰/۰۵ غذا (۰/۵ Kg/T)
۲	خوراک استاندارد GFT2 به همراه مکمل غذایی بتاپلاس به نسبت ٪۰/۱ غذا (۱ Kg/T)
۳	خوراک استاندارد GFT2 به همراه مکمل غذایی بتاپلاس به نسبت ٪۰/۱۵ غذا (۱/۵ Kg/T)
۴	خوراک استاندارد GFT2 به همراه مکمل غذایی بتاپلاس به نسبت ٪۰/۲ غذا (۲ Kg/T)
۵	خوراک استاندارد GFT2 (شاهد)

اندازه‌گیری پارامترهای کیفی آب

عوامل محیطی مختلف مانند میانگین درجه حرارت، اکسیژن محلول و pH آب در روزهای زیست‌سنجی اندازه‌گیری (توسط دستگاه WTW مدل Multi 340i) و کنترل شد. میانگین دما با ۳ بار قرائت دماسنج ثابت در حوضچه‌ها در ساعات ۶، ۱۴ و ۲۲ ثبت شد.

زیست‌سنجی و شاخص‌های رشد

در ابتدا و انتهای دوره پرورش ۱۰ نمونه بچه ماهی از هر حوضچه (با ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۱ گرم) زیست‌سنجی شدند. برای زیست‌سنجی ماهیان با تخته بیومتری نیز ۱۰ قطعه بچه ماهی از هر تراف به طور تصادفی صید و با تریکائین متان‌سولفونات (MS-222؛ ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر؛ pH ۷) بیهوش شد.

شاخص‌های رشد شامل ضریب رشد ویژه (SGR[1])، ضریب تبدیل غذایی (FCR[2])، درصد افزایش وزن بدن (PBWI[3]) و میانگین رشد روزانه (ADG[4]) ماهیان بررسی شد (Shepherd and Bromage, 1992).

رابطه ۲: درصد افزایش وزن بدن (PBWI)

$$\mathbf{PBWI} = \frac{BW_f - BW_i}{BW_i} \times 100$$

BW_f: وزن نهایی (گرم)؛ BW_i: وزن اولیه بدن (گرم).

رابطه ۳: ضریب تبدیل غذایی (FCR)

$$\mathbf{FCR} = \frac{F}{W_f - W_i}$$

F: مقدار غذای مصرف شده؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ W_i: وزن اولیه بدن (گرم).

رابطه ۴: ضریب رشد ویژه (SGR)

$$\mathbf{SGR} = \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \times 100$$

$\ln W_f$: لگاریتم طبیعی وزن نهایی (گرم)؛ $\ln W_i$: لگاریتم طبیعی وزن اولیه (گرم)؛ t: طول دوره پرورش (روز).

رابطه ۵: میانگین رشد روزانه (ADG)

$$\mathbf{ADG(\%)} = \left[\frac{\mathbf{Wt - Wi}}{\mathbf{Wi \times T}}\right] \times \mathbf{100}$$

W_i: وزن اولیه ماهی؛ W_t: وزن نهایی ماهی؛ T: طول مدت پرورش.

1- Specific Growth Rate
2- Food Conversion Ratio
3- Percent Body Weight Increase
4- Average Daily Growth

روش خون‌گیری و شاخص‌های خونی

در انتهای دوره پرورش، از رگ‌های ناحیه زیرین ساقه دمی[1] ماهیان خون‌گیری انجام شد (با سرنگ). سپس نمونه‌های خون هپارینه به طور جداگانه درون ویال‌ها (Eppendorf) ریخته شدند و در یک مخزن حاوی یخ به آزمایشگاه هماتولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (ساری، مازندران) انتقال داده شدند. سپس بلافاصله شاخص‌های خونی و فاکتور ایمنی IgM خون بررسی شد.

تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) به روش Klontz (۱۹۹۴) و با کمک میکروسکوپ نوری (نیکون مدل E600) شمرده شد و تعداد آن‌ها در هر میلی‌متر مکعب به دست آمد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با تهیه گسترش خونی و شمارش زیگزاگ (Klontz, 1994) انجام شد. حجم فشرده گلبول‌های قرمز یا هماتوکریت پس از سانتریفیوژ لوله‌های مویینه با میکروسانتریفوژ (مدل D-78532 Tuttlingen، شرکت Hettich، آلمان) با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه (Houston, 1990)، به دست آمد. غلظت هموگلوبین به روش کالریمتریک سیانو هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6505-UV/VIS، شرکت Jenway، ساخت انگلستان) و با استفاده از کیت پارس آزمون (ساخت ایران)، بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه شد.

سنجش فاکتور ایمنی خون

واکنش‌های رسوبی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در محلول‌های رقیق می‌تواند موجب انعکاس و تفرق نور شود. از این ویژگی برای تعیین مقدار شاخص ایمونوگلوبین IgM سرم بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر به وسیله کیت آزمایشگاهی Binding Site و به روش نفلومتری استفاده شد. روش نفلومتری در واقع سنجش میزان نوری است که برای عبور از محیط شفاف از مسیر اصلی منحرف می‌شود (Houston, 1990).

شمارش فلور باکتریایی روده

آماده‌سازی محیط‌های کشت

جهت آماده‌سازی محیط‌های کشت TSA[2] ابتدا محیط کشت توزین و با یک لیتر آب مقطر داخل بالون مخلوط شد، سپس روی شعله حرارت دید تا حل شود. محیط کشت

1- Caudal Vein or Artery

2- Triptic Soy Agar

پس از جوش آمدن، داخل اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شد و پس از سرد شدن به داخل پلیت‌های استریل منتقل شد. از محیط‌های کشت پس از سرد شدن برای کشت باکتری استفاده شد. بعد از ریختن محیط کشت به داخل پلیت‌های، عمل استریل کردن با قرار دادن آن‌ها در اتوکلاو صورت گرفت (Jones et al., 1993).

آماده‌سازی رقت‌های محلول روده و آب

پس از زیست‌سنجی، بچه‌ماهیان با MS-222 بیهوش و سپس ضدعفونی شدند و سطح شکمی آن‌ها باز شد. سپس روده جمع‌آوری، بازگشایی و تخلیه شد و پس از شستشو وزن شد. از جمعیت باکتریایی روده نیز نمونه‌هایی در رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۶}$ تهیه شد. کشت اولیه با ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در محیط کشت TSA برای باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری به صورت خطی و به کمک آنس در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز انجام شد. همچنین برای باکتری پروبیوتیک از هر رقت بر روی محیط کشت MRS Agar تهیه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت در جار بی‌هوازی به همراه جو ۵٪ حاوی CO_2 (یا Jar Candle) قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها بر اساس لگاریتم CFU (تعداد کلنی در واحد g) شمارش شدند (Ringo and Gatesoupe, 1998). به منظور انجام شمارش و تهیه کشت خالص، کلنی‌ها بر اساس رنگ، شکل و اندازه مورد بررسی قرار گرفتند (Prol-Garcia et al., 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جامعه آماری با تعداد ۵۸۵ عدد بچه ماهی آزاد دریای مازندران انتخاب شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapirp-Wilk بررسی شد. برای بررسی داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای تعیین اختلافات در سطح اطمینان ۰/۰۵ از تست تکمیلی دانکن (Duncan) استفاده شد. برای تعیین همبستگی بین پارامترها از آزمون رگرسیون خطی استفاده شد. تمام محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۷ و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel انجام شد.

نتایج

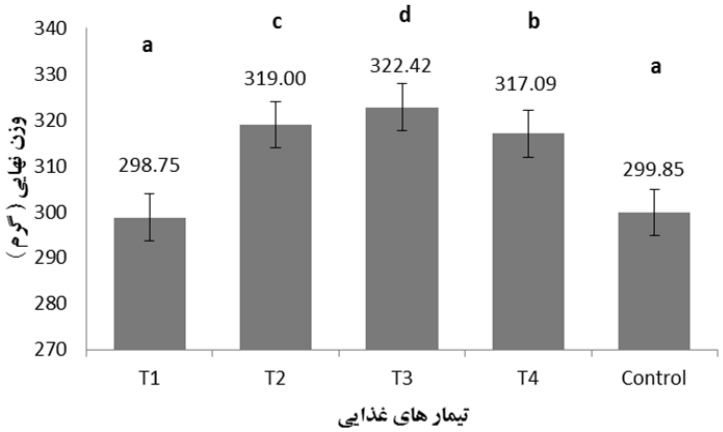
بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نشان داد که در طول دوره آزمایش متوسط

دمای آب ۰/۲۱۰±۱۶/۴۸ درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن محلول ۰/۰۹±۶/۱۱ میلی‌گرم در لیتر و pH نیز ۰/۱۲±۷/۰۷ بود.

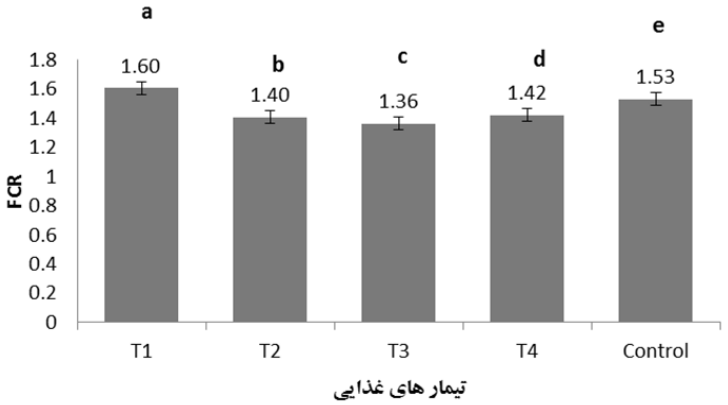
شاخص‌های رشد

با توجه به نتایج و مطابق شکل‌های ۱ تا ۳، در پایان دوره بالاترین BW_f یا میانگین وزن نهایی با ۳۲۲/۴۲ گرم، بیش‌ترین SGR با ۱/۰۷ و کم‌ترین FCR با ۱/۳۶ همگی در تیمار شماره ۳ (با ۱/۵ Kg/T بتاپلاس) به دست آمد ($P\leq۰/۰۵$). این برتری هم نسبت به سایر تیمارهای حاوی پروبیوتیک و هم نسبت به تیمار شاهد بود.

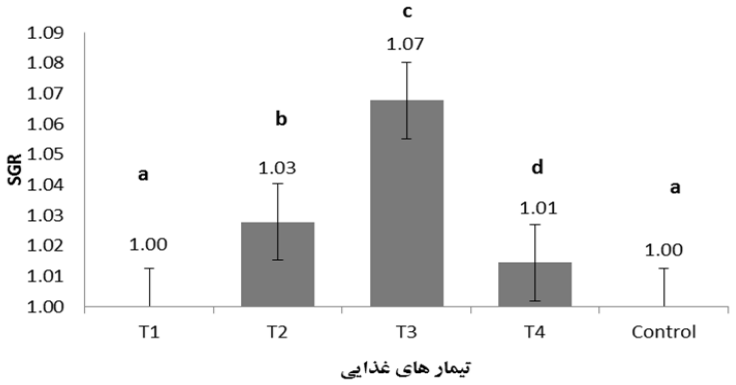
شکل‌های ۴ و ۵ نمودار تغییرات درصد افزایش وزن (PBWI) و درصد رشد روزانه (ADG) را نشان می‌دهند. مطابق آن‌ها بالاترین مقادیر شاخص‌های PBWI (با ۱۹۸/۸۴ درصد) و ADG (با ۱/۹۵ درصد) مجدداً در تیمار ۳ به دست آمد ($P\leq۰/۰۵$). این درحالی است که تیمار شاهد و تیمار ۱ (۰/۵ Kg/T) کم‌ترین مقادیر شاخص‌های فوق را به ترتیب در PBWI با ۱۷۷/۸۹ و ۱۷۸/۳۲ درصد و در ADG به ترتیب ۱/۷۴ و ۱/۷۵ درصد نشان دادند.



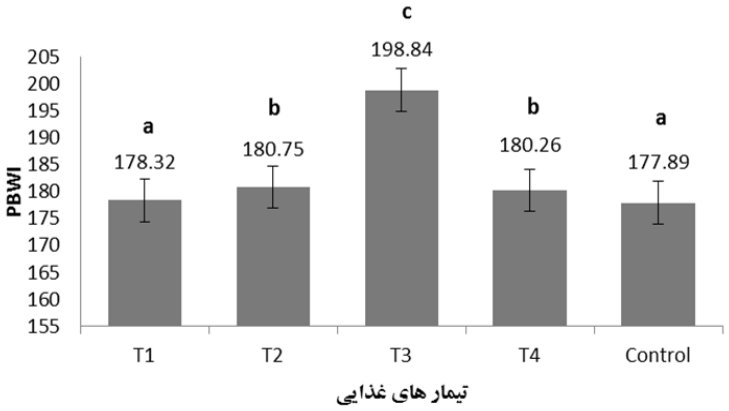
شکل ۱: میانگین وزن نهایی بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



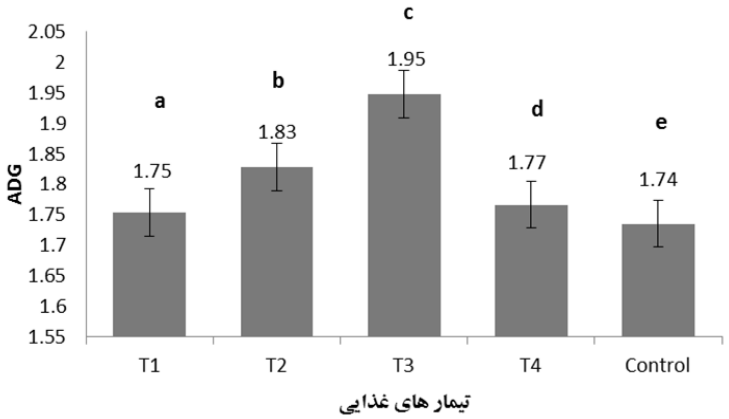
شکل ۲: میانگین ضریب تبدیل غذایی (FCR) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۳: میانگین ضریب رشد ویژه (SGR) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۴: میانگین درصد افزایش وزن بدن (PBWI) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۵: میانگین درصد رشد روزانه (ADG) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.

فاکتورهای خونی

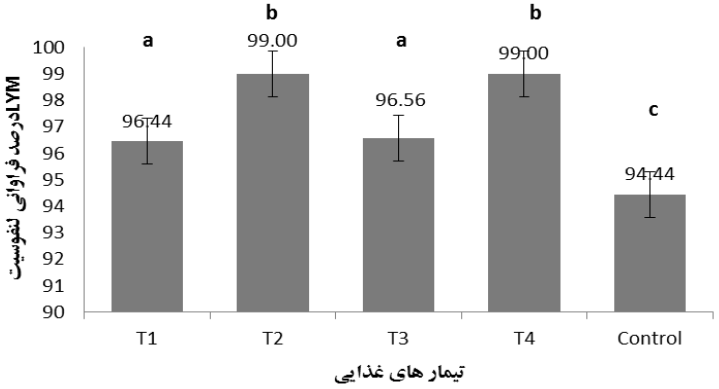
شکل‌های ۶ تا ۱۱ تغییرات شاخص‌های خونی بین تیمارهای مختلف را نشان می‌دهند. مطابق نتایج، با وجود بیش‌تر بودن تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در تیمار ۳، اختلاف معنی‌داری در تعداد آن‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همین نتایج برای درصد فراوانی

نوتروفیل‌ها (Neu) و تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) به دست آمد (P>۰/۰۵)، با این استثنا که در تیمار ۴ (۲ Kg/T بتاپلاس) RBC با تعداد $۱/۰۲×۱۰^{۶}$ در میلی‌متر مکعب بالاترین میزان را داشت (P≤۰/۰۵).

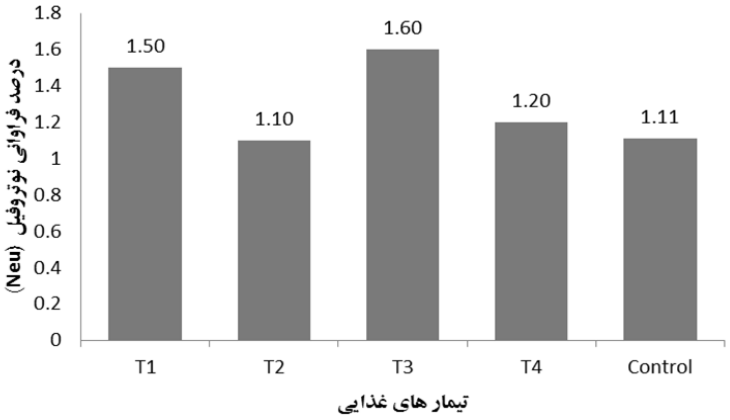
کم‌ترین درصد فراوانی لنفوسیت (LYM) مربوط به به تیمار شاهد بود (P≤۰/۰۵). تیمارهای شاهد و شماره ۱ (۰/۵ Kg/T) که حداقل غلظت بتاپلاس را داشتند، بالاترین درصد هماتوکریت (HCT) را به ترتیب با ۳۶/۰۰ و ۳۶/۷۸ درصد نشان دادند (P≤۰/۰۵). مطابق شکل ۱۱ مقادیر متفاوتی از هموگلوبین (Hb) در بین تیمارها دیده شد که در این میان تیمارهای ۳ و ۴ کم‌ترین میزان Hb را نشان دادند (P≤۰/۰۵).

در ارزیابی حاصل از میانگین ایمونوگلوبین M سرم (IgM)، اختلافی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها دیده نشد (P>۰/۰۵؛ شکل ۱۲).

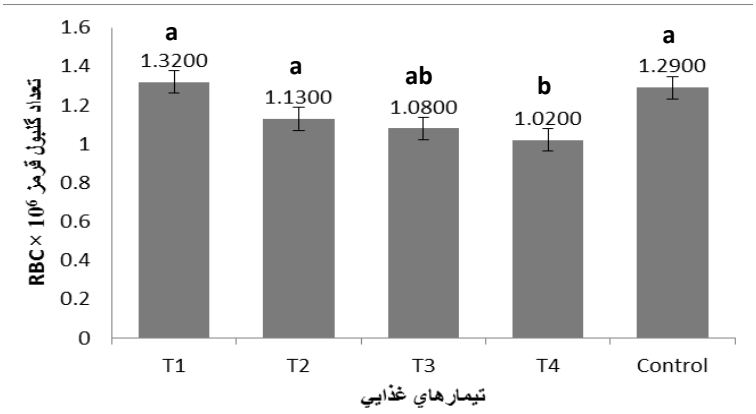
شکل ۶: میانگین تعدادگلبول سفید (WBC) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.



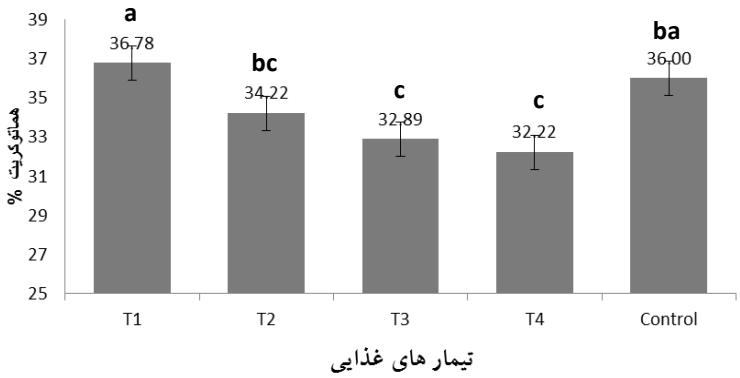
شکل ۷: میانگین درصد فراوانی لنفوسیت (LYM) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



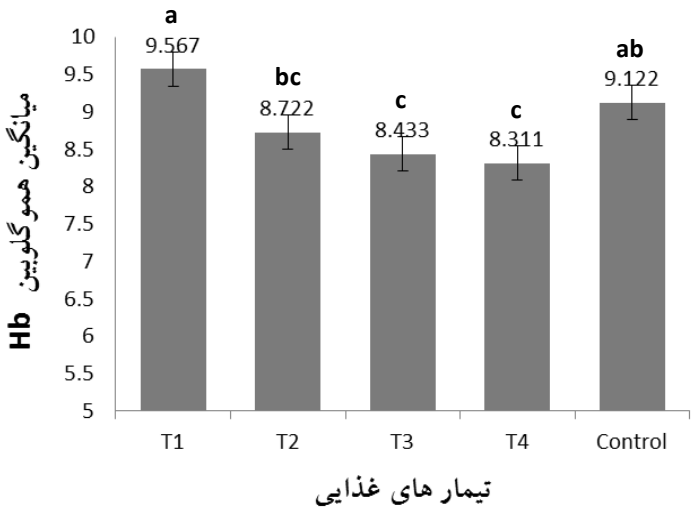
شکل ۸: میانگین درصد فراوانی نوتروفیل (Neu) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.



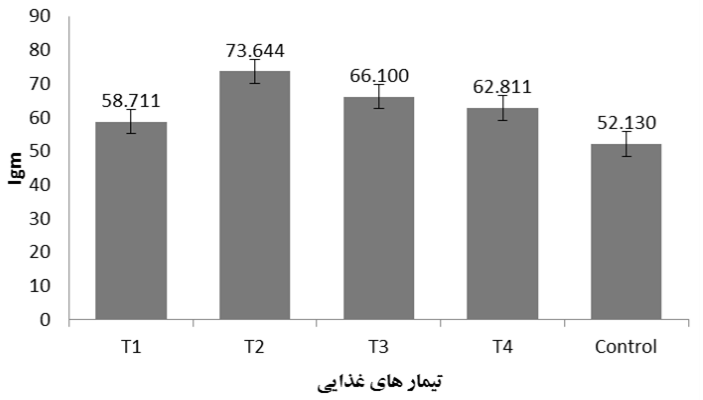
شکل ۹: میانگین تعداد گلبول قرمز (RBC) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۱۰: میانگین درصد هماتوکریت (HCT) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۱۱: میانگین هموگلوبین (Hb) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.

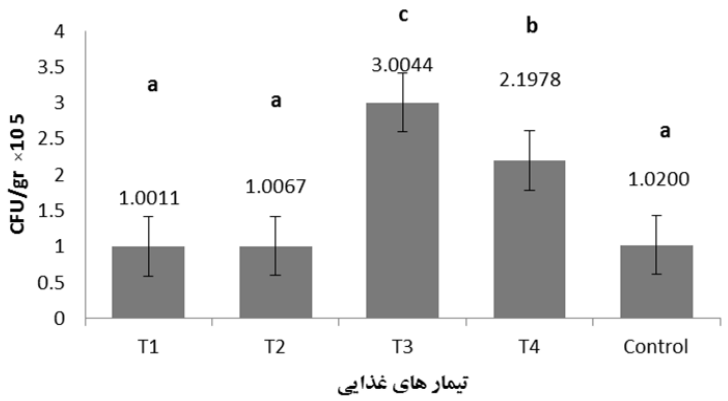


شکل ۱۲: میانگین ایمونوگلبولین M سرم (IgM) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

شمارش جمعیت فلور باکتریایی روده

مطابق آنچه که در شکل ۱۳ دیده می‌شود بیش‌ترین شمارش جمعیت فلور باکتریایی روده در تیمار ۳ (۱/۵ Kg/T) با CFU/g $۳/۰۰\times۱۰^{۵}$ به دست آمد (P<۰/۰۵) و تیمارهای ۱، ۲ و شاهد (با کم‌ترین غلظت

بتاپلاس) نیز پایین‌ترین میکروفلور باکتری‌ها را داشتند.



شکل ۱۳: میانگین شمارش میکروفلور باکتریایی روده (CFU/gr ۱۰^۵×) بر اساس تیمارهای غذایی (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث

در مطالعه حاضر برای رفع مشکلات موجود جهت معرفی ماهی آزاد دریای مازندران به عنوان گونه بومی برای سیستم‌های پرورشی از پروبیوتیک استفاده شده است و نتایج حاصل از ۳ ماه تغذیه با تیمارهای حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک اثرات مثبتی را بر روی این ماهی نشان داده است. به طوری که افزایش سطوح پروبیوتیک مزبور موجب بهبود قابل ملاحظه پارامترهایی نظیر میانگین رشد روزانه، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR) و درصد افزایش وزن بدن (BW_f) شده است.

بیان شده است که پروبیوتیک‌ها با تولید ویتامین‌ها، سم‌زدایی از جیره غذایی و یا تجزیه ترکیبات غیر قابل هضم، اشتها را تحریک می‌کنند و شرایط تغذیه‌ای بهتری را در ماهی به وجود می‌آورند (Irianto and Austin, 2002). مهم‌ترین دلیل این امر احتمالاً در ارتباط با تولید آنزیم‌هایی مانند آنزیم‌های پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک توسط باکتری های موجود در پروبیوتیک مصرفی است که ترکیبات ماکرومولکول پروتئینی را به پپتیدها و آمینواسیدها هیدرولیز می‌کنند (Fuller and Perdigon, 2003). از طرف دیگر باکتری‌های

B. subtilis و *B. licheniformis* موجود در پروبیوتیک مورد استفاده، قادر به شکستن پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها بوده، توانایی تولید بعضی ویتامین‌های متعلق به گروه B همچون بیوتین (H) و سیانوکوبالامین ($B_{۱۲}$) دارند که می‌تواند فاکتور دیگری برای متابولیسم بهتر مواد غذایی در این موجودات باشد (Hansen and Olafsen, 1999؛ Ali, 2000).

در بین گروه‌های مختلف آزمایشی که از مقادیر متفاوت پروبیوتیک تغذیه شدند ماهیان تیمار ۳ حاوی ۱/۵ کیلوگرم در هر تن، بیش‌ترین بهبود را در شاخص‌های رشد نشان دادند که با یافته‌های سایر پژوهشگران از جمله Rengpipat و همکاران (۱۹۹۸)، Ghosh و همکاران (۲۰۰۲)، Taoka و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت. در واقع پایین بودن شاخص‌های رشد ماهیان تیمار شاهد در مقایسه با سایر تیمارهای حاوی پروبیوتیک، ناشی از عدم استفاده از مکمل غذایی است. نتایج همچنین حاکی از اختلافات مشهود پارامترهای رشد بین تیمارهای مختلف است به طوری که ماهیان تیمار ۳ دارای وزن نهایی بالاتری (۲۲۳گرم)، کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی (FCR با ۱/۳۶) و بیش‌ترین نرخ رشد ویژه (SGR) بودند.

بالاتر بودن وزن نهایی را پژوهشگران دیگر نیز با افزودن انواع پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی آبزیان پرورشی به دست آورده بودند به طوری که Rengpipat و همکاران (۱۹۹۸) با پروبیوتیک *Bacillus* S_{11} در میگو *Penaeus monodon*، Taoka و همکاران (۲۰۰۶) در فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، Ghosh و همکاران (۲۰۰۲) در لارو ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohita*)، Aubin و همکاران (۲۰۰۵) در ماهیان قزل‌آلا و Shelby و همکاران (۲۰۰۶) در ماهیان تیلاپیلای نیل و گربه ماهی با استفاده از باکتری‌های *Bacillus* و *Pediococcus* به دست آوردند. Naseri و همکاران (۲۰۱۳) نیز به نقش مثبت پروبیوتیک‌ها در افزایش وزن لارو ماهیان قزل‌آلا با افزودن یک درصد پروبیوتیک Bioplus 2B به جیره غذایی اشاره کردند.

پایین‌تر بودن FCR را می‌توان در تحریک اشتها به وسیله پروبیوتیک‌ها جستجو کرد به طوری که با تولید ویتامین‌ها و آنزیم‌های گوارشی نظیر پروتئازها و تجزیه ترکیبات غیر قابل هضم، شرایط تغذیه‌ای بهتری را در ماهی ایجاد می‌کند و برآیند این تغییرات موجب جذب مناسب‌تر مواد غذایی و تولید گوشت خواهد شد (Irianto and Austin, 2002). در

برخی مطالعات به احتمال افزایش جذب مواد غذایی موجود در جیره با استفاده از پروبیوتیک‌ها نیز اشاره شده است (Khattab et al., 2005؛ Ghosh et al., 2002).

دلیل عمده بهبود SGR به تسهیل فعالیت‌های آنزیمی و کمک به هضم بهتر به واسطه تولید آنزیم‌های خارجی توسط باکتری‌های به کار رفته وابسته است (Ghosh et al., 2002). همراه با افزایش فعالیت آنزیمی، تولید ویتامین B_{12} و به دنبال آن کوآنزیم‌های مرتبط با چرخه تولید انرژی (ATP) نیز می‌تواند از دلایل دیگر باشد (Gatesoupe, 1999؛ Fuller, 1989).

عدم تلفات و بازماندگی کامل در تیمارهای آزمایشی بیانگر کنترل شرایط پرورش بود و با مطالعاتی همچون مطالعه Farzanfar و همکاران (۲۰۰۷) روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Taoka و همکاران (۲۰۰۶) روی ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) و Naser و همکاران ۱۹۹۸ روی ماهی آزاد (*Salmo salar*) که تلفاتی در گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده نشد، مطابقت داشت.

بالاتر بودن شاخص‌های رشد در تیمار ۱/۵ Kg/T نشان می‌دهد که با سپری شدن دوره آزمایش و تغذیه ماهیان با مکمل حاوی بتاپلاس، میکروفلورهای دستگاه گوارش با جیره غذایی ارائه شده، آداپته شد و باکتری‌های باسیلوس موجود در بتاپلاس موفق به رقابت با میکروفلورهای موجود در روده شدند که منجر به تشکیل کلنی موثری شد (شکل ۱۳).

بنابراین تاثیر مکمل غذایی بتاپلاس بر کارایی دستگاه گوارش و هضم و جذب جیره‌های غذایی حاوی آن افزایش یافت و نهایتاً منجر به بهبود کلیه شاخص‌های رشد در ماهیانی که از جیره حاوی مکمل تغذیه کردند، شد (شکل‌های ۱ تا ۵).

نکته قابل توجه این است که با افزایش مکمل‌های پروبیوتیک بیش‌تر از ۱/۵ کیلوگرم در هر تن خوراک (تیمار ۴ با ۲Kg/T)، اثرات مثبت پروبیوتیک به طور قابل ملاحضه‌ای کاهش یافت. این امر به دلیل اثرات منفی پروبیوتیک در سطوح بالاتر است. به این ترتیب که نتایج بررسی برخی پارامترهای خونی مانند میزان هموگلوبین خون، روندی کاهشی را نشان داد (شکل ۱۱). پژوهشگران این امر را به دلیل رقابت باکتری‌های پروبیوتیکی با سلول‌های بدن در جذب اسید فولیک موجود در خوراک ذکر کرده‌اند (Mohan و همکاران، ۱۹۹۶).

نتایج همچنین نشان داد که افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک به خوراک ماهیان آزاد، با وجود بالاتر بودن در تیمارهای آزمایشی، سبب افزایش معنی‌دار تعداد کل گلبول‌های سفید خون نسبت به گروه شاهد نشد (P>۰/۰۵).

تاکنون مطالعات محدودی درباره تاثیر پروبیوتیک‌ها بر شاخص تعداد گلبول سفید خون آزادماهیان انجام شده است؛ با این وجود بیان شده است که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی بادی‌ها ارتباط دارد (Irianto and Austin, 2002)، چرا که برخی عوامل سلولی از قبیل عملکرد فاگوسیتوزی گلبول‌های سفید (Jones et al., 1993) و فعالیت لنفوسیت‌ها (Anderson et al., 1979) نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی‌ها ایفا می‌کند. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبول‌های سفید انسان توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موجود است (Oyetayo and Oyetayo, 2005). به علاوه Aattouri و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که تلقیح باکتری‌های اسید لاکتیک به موش موجب افزایش لنفوسیت‌ها می‌شود که آثار مفید این عمل منجر به افزایش مقاومت موش در برابر عفونت‌ها است. در مطالعه حاضر نیز تعداد کل گلبول‌های سفید در تیمارهای حاوی پروبیوتیک، افزایش یافت.

افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک به غذای تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون در ماهیان آزاد تیمار ۴ نسبت به گروه شاهد شد.

دیواره سلولی گلیکوپپتیدی باسیلوس‌ها ممکن است از طریق فعال‌سازی لنفوسیت‌ها به افزایش پاسخ ایمنی موجود آبزی منجر شود (Joborn et al., 1997). مطالعات Irianto و Austin (۲۰۰۲) این نظریه را که تحریک سلولی (یعنی افزایش لنفوسیت‌ها، گلبول سفید و کل تعداد ماکروفاژها و افزایش بیگانه خواری) بیش‌تر از ایمنی همورال دارای اهمیت است تایید می‌کند. همچنین Brunt و Austin (۲۰۰۵) نشان دادند که ماکروفاژهای تیمار پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد توانایی بیش‌تری برای بیگانه خواری دارند.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر روی بچه‌ماهیان آزاد دریای مازندران بیان می‌دارد که تعداد کل گلبول‌های سفید خون در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود. بنابراین بیانگر تحریک سیستم ایمنی بدن میزبان توسط این گونه از پروبیوتیک است.

بررسی‌ها نشان داد که افزودن پروبیوتیک به خوراک آبزیان موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود (Brunt and Austin, 2005; Khattab et al., 2005). از طرفی Ranzani-Paiva و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت تیلاپیای آلوده شده به *Mycobacterium marinum* ممکن است به گسترش هیپوکرومیک و آنمی میکروسیتیک منجر شود. در مطالعه حاضر تیمارهای ۳ و ۴ (۱/۵ و ۲Kg/T) کم‌ترین میزان هموگلوبین را به خود اختصاص دادند. تقریباً تمامی اکسیژن خون حیوانات به هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز متصل است و در واقع هموگلوبین حدود ۹۵٪ پروتئین داخل سلولی گلبول قرمز را شامل می‌شود. از این رو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول‌های قرمز رابطه‌ای منطقی است.

در این مطالعه میزان ایمونوگلوبین IgM به عنوان شاخص اندازه‌گیری سطح ایمنی ماهی آزاد دریای مازندران، مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد با وجود بالاتر بودن IgM از لحاظ کمی در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک، تفاوت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش شامل دو گونه باکتری *B. licheniformis* و *B. subtilis* بود و طبق مطالعات Malin و همکاران (۱۹۹۶) چندین آنتی‌بیوتیک پپتیدی شامل باستیراسین و سابتلین به ترتیب توسط باکتری‌های مذکور تولید می‌شوند، بنابراین استفاده از باسیلوس در خوراک ماهی، احتمالاً آن‌ها را نسبت به پاتوژن‌ها مقاوم می‌کند.

در واقع آنتی‌ژن‌های سطح باسیلوس و یا متابولیت‌های آن ممکن است نقش ایمونوژن را برای دفاع و ایمنی بدن ایفا کند.

همچنین ثابت شده است که سیستم ایمنی غیراختصاصی توسط پروبوتیک‌ها تحریک می‌شود (Balcazar و همکاران ۲۰۰۶) و از آنجا که باکتری‌های پروبیوتیکی تولید آنتی‌بادی را در بدن تحریک می‌کنند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که سطح IgM در تیمارهای پروبیوتیکی بالاتر نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد بیش‌تر باشد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

استفاده از باسیلوس به ویژه سویه S_{11} مقاومت در برابر بیماری‌ها را از طریق فعال کردن سیستم ایمنی همورال و سلولی افزایش می‌دهد (Rengpipat et al., 2000).

همچنین مقدار IgM با توجه به اندازه ماهی، سن، شرایط محیطی و یا وجود بیماری‌ها تغییر می‌کند (Klesius, 1990). به عنوان مثال با افزایش دمای محیط سطح ایمونوگلوبین در ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua* L.) افزایش می‌یابد (Magnadottir, 1998). در پژوهش کنونی بررسی فاکتورهای محیطی مد نظر نبوده است.

در مطالعه حاضر در کنار سایر پارامترها و به منظور کمک به تحلیل نتایج، تعداد کل باکتری‌ها در میکروفلور روده نیز شمارش شد و بنابر نتایج با افزایش غلظت پروبیوتیک بتاپلاس در خوراک ماهی آزاد دریای مازندران، افزایش قابل ملاحضه‌ای در جمعیت باکتریایی روده دیده شد. چنین نتیجه‌ای قابل انتظار بود.

باکتری‌های روده به دو گروه مضر و مفید تقسیم می‌شوند که رقابت بر سر منابع و تغییرات نقش تعیین کننده‌ای در نسبت بین آن‌ها دارد (Moriarty, 1998)؛ به طوری که می‌توان از این ویژگی و با تغییر میکروفلور روده با استفاده از پروبیوتیک، کمک شایانی به بهبود سیستم ایمنی کرد. به عنوان مثال Pybus و همکاران (۱۹۹۴) با استفاده از سویه *Vibrio anguillarum* به عنوان پروبیوتیک و در واقع یک سد دفاعی با تولید آنزیم‌ها و ویتامین‌های موثر در امر هضم غذا، توانستند عوامل بیماریزای *V. ordalii* آزادماهیان را مهار کنند.

ترکیب میکروفلور آبزیان تحت تاثیر فشارهای محیطی (Ringo et al., 1997; Kennedy et al., 1998)، جیره غذایی (Munro et al., 1994; Ringo et al., 1997) و سن ماهی (Olafsen, 2001) تغییر می‌کند.

در مطالعه حاضر شرایط محیطی و سن ماهیان مورد مطالعه تقریباً یکسان بود، بنابراین می‌توان وجود درصد بالای باسیلوس در روده را به پروبیوتیک موجود در جیره غذایی نسبت داد. به طوری که بیش‌ترین میزان باکتری روده در تیمار ۴ و سپس در تیمار ۳ مشاهده شد. چنین نتیجه‌ای را پژوهشگرانی همچون Ringo و همکاران (۱۹۹۶) و Gildberg و همکاران (۱۹۹۵) بیان کرده بودند.

از آنجائی که در پژوهش کنونی پروبیوتیک دائماً از طریق غذا وارد دستگاه گوارش شده، بنابراین در مورد توانایی تکثیر آن در روده نمی‌توان نظر قطعی داد ولی با توجه به تراکم بالای آن در روده ماهی آزاد، می‌توان گفت باسیلوس‌ها قدرت جاگیری بالا و توانایی پایداری زیادی در برابر شرایط محیطی داخلی

روده داشتند. ولی با توجه به نتایج حاصله چنین به نظر می‌رسد که استفاده از مکمل بتاپلاس سبب افزایش جمعیت باکتریایی ماهیان به ویژه باسیلوس‌ها می‌شود که علاوه بر مفید بودن در فرآیند هضم، بیانگر این است که فلور روده ماهیان تحت تاثیر شرایط محیطی قرار دارد.

با توجه به نتایج حاصله و تحلیل‌های صورت گرفته، چنین نتیجه گرفته می‌شود که تاثیر استفاده از مکمل بتاپلاس بر رشد، فاکتورهای خونی، ایمنی و میکروفلور روده ماهی آزاد دریای مازندران مورد تائید قرار گرفته است. بنابراین می‌توان این مکمل را به عنوان یک محرک رشد در پرورش آزادماهیان دریایی مطرح و معرفی کرد و به واسطه آن شاخص‌های رشد نظیر وزن نهایی، در صد افزایش وزن، FCR و SGR را به طور معنی‌داری ارتقا داد. نهایتاً براساس نتایج حاصله و با در نظر گرفتن مسئله حداقل میزان پروبیوتیک جهت حصول بهترین نتایج، تیمار ۳ (با ٪۰/۱۵ یا ۱/۵ کیلوگرم مکمل بتاپلاس در هر تن خوراک) برای بهبود روند پرورش ماهی آزاد دریای مازندران، بهترین دز پیشنهادی معرفی می‌شود.

منابع

Aattouri N., Bouras M., Tome D., Marcos A. and Lemonnier D. 2001. Oral ingestion of lactic acid acteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon production. The British Journal of Nutrition, 87(4): 367–373.

Abdoli A. and Naderi M. 2009. Biodiversity of Fishes of the Southern Basin of the Caspian Sea. Abzian Scientific Publications, Tehran. 243P.

Ali A. 2000. Probiotics in fish farming-evaluation of a candidate bacteria mixture. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agriculture Science. 95P.

Anderson D.P., Roberson B.S. and Dixon O.W. 1979. Plaqueforming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a Yersinia ruckeri Oantigen preparation. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 36(6): 636–639.

Aubin J., Gatesoupe F.J., Labbe L. and Lebrun L. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquacultre Research, 36(8): 758–767.

Balcazar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D. and Muzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114: 173–186.

Brunt J. and Austin B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28: 693–701.

Burr G. Gatlin D. and Ricke S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society, 36(4): 425–436.

Chang C.I.W. and Liu W.Y. 2002. An evolution of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in dultured European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Disseseases, 25: 311–315.

Esiobu N., Armenta L. and Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. International Journal of Environmental Health Research, 12(2): 133–144.

Farzanfar A. 2005. Salmonid Aquaculture. Iranian Fisheries Research Organization, IFRO. 215P.

Farzanfar A., Lashto Aghaei G., Alizadeh M., Bayati M. and Ghorban R. 2007. Study on growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae with different concentration of probiotic in diet. P: 95–114. In: Wright J.A. and Friedman R.H. (Eds.). Proceedings of Aquaculture, San Antonio. TX: US Aquaculture Society.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365–378.

Fuller R. and Perdigon G. 2003. Gut flora, immunity and health. Blackwell publishing. 276P.

Gatesoupe F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture: A review. Aquaculture, 180: 147–165.

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

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

Gomez-Gil B., Roque A. and Turnbull J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture oflarval aquatic organisms. Aquaculture 191,259-270.

Hansen G.H. and Olafsen J.A. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology, 38(1): 1–26.

Hedayatifard M. and Ramezani H. 2007. Applied Ichthyology. Scientific Publication of Islamic Azad University. 226P.

Houston A.H. 1990. Blood and circulation. P: 273–335. In: Schreck C.B. and Moyle P.B. (Eds.). Methods in Fish Biology., American Fisheries Society Bethesda, Maryland, USA.

Irianto A. and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture: Reviews. Journal of Fish Diseases, 25: 633–642.

Joborn A., Olsson C., Westerdahl A., Conway P.L. and Kjellberg S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extract by *Camobacterium* sp. Strain. Journal of Fish Disease, 20: 383–392.

Jones S.R.M., Stevenson RM.W. and Paterson W.D., 1993. Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

lymphocytes in response to the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 4: 93–95.

Kazanchiev E.N. 1981. Fishes of Casipan Sea. Moscow, Lectures of Fisheries. 160P.

Kennedy S.B., Tucker I.W., Neidig C.L., Vermeer G.K., Cooper V.R., Jarrell J.L. and Sennett D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: A case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). Bulletin of Marine Science, 62: 573–588.

Khattab YA.E., Shalaby AM.E. and Abdel-Rhman A.A. 2005. Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 28: 74–81.

Klesius P.B. 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in Channel catfish, Ictalurus punctatus. Veterinary Immunology and Immunopathology, 24: 187–195.

Klontz G.W. 1994. Fish Hematology. P: 121–132 .In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Rowley A.F., Kelikoff T.C., Kaattari S.L. and Smith S.A. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. SOS Publications.

Kreuzer M. 1994. Probiotic-antibiotic interactions in performance, intestinal fermentation and manure properties of piglets using a *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) preparation and carbadox. Agribiological Research, 47: 13–23.

Magnadottir B. 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. Icelandic Agricultural Sciences, 12: 47–59.

Malin M., Suomalainen H., Saxelin M. and Isolauri E. 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. Annals of Nutrition and Metabolism, 40(3): 137–145.

Mohan B. Kadirvel R., Natarajan A. and Bhaskaran M. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth nitrogen utilization and serum cholestrol in broilrs. British Poultry Science, 37(2): 395–401**.**

Moriarty D.J.W. 1998. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial Interactions in Aquaculture, 164(1-4): 351–358.

Munro P.D., Barbour A. and Birkbeck T.H. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start feeding larval turbot reared under different conditions. Journal

Applied Bacteriology, 77: 560–566.

Naser N., Lall S.P., Brown L. and Olivier G. 1998. Role of dietary iron in immune response and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture. 98, Las Vegas, NV (USA). 447P.

Naseri S., Khara H. and 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. Journal of Applied Animal Research, 41(3): 318–325.

Nelson J.S. 2006. Fishes of the World. Hoboken (New Jersey, USA): John Wiley & Sons. 601P.

Olafsen J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture, 200: 223–247.

Oyetayo V.O. and Oyetayo F.L. 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. African Journal of Biotechnology, 4(2): 123–127.

Planas D., Agusti S., Duarte C.M., Granata T.C. and Merino M. 1999. Nitrate uptake and diffusive nitrate supply in the Central Atlantic. Limnology and Oceanography, 44(1): 116–126.

Prol-Garcia M.J. Planas M. and Pintado J. 2010. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. Aquaculture, 302: 25–36.

Pybus V., Loutit M.W. Lamont L.L. and Tagg J.R. 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4355. Journal of Fish Disease, 17: 311–324.

Ranzani-Paiva M.J.T., Ishikawa C.M., Eiras A.C.D. and Silveira V.R.D. 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Brazilian Archives of Biology and Technology, 47(6): 945–953.

Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S. and Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167: 301–313.

Rengpipat S., Rukpratanporn S., Phianphak W. and Menasveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium

Bacillus S11, Aquaculture, 191: 271–288.

Ringo E. and Gatesoupe F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. Aquaculture, 160(3-4): 177–203.

Ringo E., Birkbeck T.H., Munro P.D., Vadstein O. and Hjelmeland K. 1996. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. Journal of Applied Microbiology, 81(2): 207–211.

Ringo E., Olsen R.E., Overli O. and Lovik F. 1997. Effect of dominance hierarchy formation on aerobic micro biota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic chaIT, *Salvelinus alpinus* (L.). Aquaculture Research, 28: 901–904.

Shelby R., Lim C., Yildirm-Aksoy M. and Delaney M. 2006. Effects of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Aquaculture, 18(2): 22–34.

Shepherd J. and Bromage N. 1992. Intensive fish farming. Blackwell scientific publications. 290P.

Subasinghe R. 1997. Fish health and quarantine. P: 45–49. In: FAO. Review of the state of the world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Taoka Y., Maeda H., Jo J.Y., Jeon M.J., Bai S.C., Lee W.J., Yuge K. and Koshio S. 2006. Growth, Stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys oliraceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fisheries Science, 72(2): 310–321.

Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. and Vinci B.J. 2001. Recirculating aquaculture systems. NRAC. 769P.

Verschuere L., Rombaut G., Huys G., Dhont J., Sorgeloos P. and Verstraete W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveni1es through pre-emptive colonization by selected bacterial strains. Applied and Environmental Microbiology, 65(6): 2527–2533.

Weston D.P. 1996. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. P: 140–165. In: Baird D., Beveridge M.V.M., Kelly L.A. and Muir J.F. (Eds.). Aquacultureand Water Resource Management. Blackwell, Oxford.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 3, Autumn 2015

Improvement of Growth properties, Survival, hematological-humoral immunity factors and intestinal bacterial density of brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1870) affected by different levels of Beta-Plus as probiotic

Safi Allah Askarifar[1], Masoud Hedayatifard[2]*, Hossein Khara[3]

Received: October 2015 Accepted: December 2015

Abstract

Effcts of Beta-plus as probiotic on growth properties, survival, hematological factors and intestinal bacterial density of brown trout were investigated. Numbers of 585 juveniles during 3 months have studied with 105±5 in weight, 15 basins with a density of 39 fish per 1,500 liters. Different level of Beta-plus were used ranged as 0, 0.5, 1, 1.5 and 2Kg per ton of food) with 3 repeats in a completely randomized design. The results showed according to adding the probiotics in feed, growth properties such as PBWI, BW_f, FCR and SGR were improved ($P<0.05$). In addition, fish fed with 1.5Kg/T Beta-plus showed best performance in Caspian Sea Brown trout in comparison to other treatments. Parameter of WBC had not any different among blood parameters ($P>0.05$), while the probiotic reduced amounts of RBC, Hb and HTC ($P<0.05$). Also, microflore bacteria counts were increased due to Beta-plus ($P<0.05$) statistically, but there was no different in Immunoglobin M (IgM) between treatments, as a humoral immunity parameter. Thus, supplement of Beta-plus intruduced as a growth stimulator in culture of Caspian Sea salmonid fish.

Key words: *Beta-Plus, Caspian Salmon,* Salmo trutta caspius*, Probiotic.*

1- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Guilan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
2- Associated Professor in Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
3- Associated Professor in Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
*Corresponding Author: hedayati.m@qaemiau.ac.ir