CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

اثر لاکتوباسیلوس های (Lactobacillus) جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*) بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور میکروبی روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

عالی حسینی[۱]، فاطمه چهار لنگ[۱]، ابراهیم ستوده[۱*]، مجتبی علیشاهی[۲]، محمد مدرسی[۳]

*e.sotoudeh@yahoo.com

۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی تاثیر تغذیه‌ای باکتری‌های *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus bulgaricus* جدا شده از روده ماهی شیربت بر روی عملکرد رشد، بازماندگی و فلور میکروبی روده کپور معمولی انجام شد. ۴۸۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (با میانگین وزن اولیه ۶±۴۰ گرم) به طور تصادفی در ۴ تیمار (با سه تکرار) تقسیم و با جیره های حاوی *L. plantarum* (گروه ۱)، *Lactobacillus bulgaricus* (گروه ۲)، *Lactobacillus casei* (گروه ۳) با تراکم ۵×۱۰^{۷} CFU/g و جیره‌ی فاقد مکمل پروبیوتیکی (شاهد) به مدت ۶۰ روز صورت دستی تغذیه شدند. جهت ارزیابی میزان حضور باکتری و تاثیر روی فلور میکروبی دستگاه گوارشی، تغذیه از روز۶۰ تا ۷۵ با جیره‌ی فاقد پروبیوتیک صورت‌گرفت. در روز ۷۵ آزمایش ضریب رشد ویژه ماهی تغذیه شده با جیره‌ی حاوی *L. bulgaricus* بطور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). در روز ۶۰ و ۷۵ آزمایش ضریب تبدیل غذایی ماهیان تغذیه شده با جیره‌ی حاوی باکتری *L. casei* بطور معنی داری نسبت به گروه شاهد پایین تر بود ($p<۰/۰۵$). از طرفی میزان بازدهی پروتئین و نرخ رشد ویژه ماهیان تغذیه شده با این باکتری ها در زمان های مختلف آزمایش نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. نتایج ارزیابی فلور باکتری دستگاه گوارش ماهیان نشان‌داد مقدار Lactobacillus های روده در روز۳۰ و۶۰ آزمایش بطور معنی‌داری در مقایسه با ماهیان گروه شاهد افزایش پیدا کرده است ($p<۰/۰۵$). در روز۳۰ آزمایش گروه ۲ و ۳ بیشترین مقدار باکتری Lactobacillus در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۵$). درمجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد افزودن باکتری های Lactobacillus های جدا شده از روده ماهی شیربت در جیره‌ی ماهی‌کپور معمولی باعث افزایش جمعیت باکتری‌های سودمند فلور میکروبی روده گردیده و نهایتاً عملکرد رشد و تغذیه این ماهی را بهبود می‌بخشد.

لغات کلیدی : پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، رشد، فلور باکتریایی، کپور معمولی، ماهی شیربت

*نویسنده مسئول

مقدمه

در حال حاضر صنعت آبزی‌پروری سریع‌ترین سرعت رشد را در صنایع تولید مواد غذایی دارد. بطوریکه تولیدات جهانی آبزی پروری با نرخ متوسط سالانه ۶/۲ درصدی از ۳۲/۴ میلیون تن به ۶۶/۶ میلیون تن از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۲ میلای رسیده است (SOFIA, 2014). این افزایش تولید نیازمند استفاده از خوراک های با کیفیت و حاوی میزان پروتئین بالا می باشد. علاوه بر این، نه تنها مواد مغذی اصلی (پروتئین، چربی، کربوهیدرات و ...) بلکه مواد افزودنی مکمل نیز بایستی جهت سلامتی و رشد مطلوب در جیره آبزیان گنجانیده شود. بیشترین مکمل های افزودنی جیره آبزیان شامل هورمون ها، آنتی بیوتیک ها، یونوفورها و برخی از نمک ها می باشند(Fuller, 1992; Gongora, 1998; Klaenhammer and Kullen, 1999). اگرچه این مکمل ها موجب افزایش رشد می شوند، اما استفاده نادرست از آنها می تواند باعث بروز عوارض جانبی در حیوان و مصرف کننده نهایی و همچنین ممکن است منجر به مقاومت دارویی (در مورد آنتی بیوتیک ها) گردد. این موضوع محقیقن را وادار به جستجو برای یافتن یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک ها کرده است. یکی از جایگزین های مناسب، استفاده از باکتری های مفید (پروبیوتیک) برای مبارزه با باکتری های بیماری زا، با حذف رقابتی است، که یک شیوه قابل قبول در پرورش دام است (Sissons, 1989). پروبیوتیک‌ها مانند باکتری‌های اسید لاکتیک عوامل زیستی دوستانه هستند که جهت رقابت و مقابله با عومل بیماری‌زا و افزایش رشد جانوران اضافه می شوند (Gatesoupe, 1999). بطوریکه در سال ۲۰۰۸ میلادی بازار جهانی برای پروبیوتیک ها ۱۵۹۰۰ میلیون دلار آمریکا بوده است و پیش بینی می شود این میزان سالیانه ۴/۳ درصد افزایش یابد (Soccol *et al.*, 2010).

بررسی های انجام شده نشان می هد پروبیوتیک ها موجب افزایش رشد و کارائی مصرف غذا در ماهیانی مانند تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Lara-Flores *et al.*, 2003)، (*Solea senegalensis*) Saenz de Rodriganez, *et al.*, 2009)، سیم دریایی (*Sparus aurata*) Farzanfar, 2006)، کپور معمولی (Yanbo and Zirong, 2006)، شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) (ضیایی نژاد و همکاران، ۱۳۹۳) و ماهیان خاویاری (Hoseinifar *et al.*, 2014) می گردد. با این حال عواملی مثل نوع پروبیوتیک، میزان آن، مدت استفاده و سن و اندازه میزبان و عوامل متعددی در تعیین اثر بخشی پروبیوتیک های مورد استفاده در ماهی تاثیر گذار است و به همین دلیل نتایج متفاوتی در این زمینه گزارش شده است (Austin and Austin, 2007).

بیشتر پروبیوتیک های مورد استفاده در آبزی پروی، پروبیوتیک تجاری تولید شده برای حیوانات خشکی زی است. این در حالیست که ممکن است پروبیوتیک مناسب برای آبزی پروری با حیوانات خشکی زی متفاوت باشد (Gatesoupe, 1999). Gatesoupe (۱۹۹۹) بیان می کند تولید پروبیوتیک تجاری ویژه برای استفاده در آبزی پروری ضروری است. این محقق همچنین نشان داد بر خلاف پروبیوتیک تجاری، باکتریهای روده بومی ماندگاری بیشتر در روده دارند و در نتیجه، این باکتری ها می توانند موثر تر از باکتری های تجاری باشند. در طول دهه گذشته، تحقیقات زیادی در زمینه شناسایی باکتری های مفید از آبزیان و تلاش در جهت تجاری سازی این باکتری ها به عنوان مکمل پروبیوتیکی در غذای آبزیان انجام شده است (Lee *et al.*, 2015). بطور مثال استفاده از پروبیوتیک بومی جدا شده از شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)، نشان داد که ماندگاری این باکتری ها در روده نسبت به پروبیوتیک تجاری بسیار طولانی‌تر بسیار بیشتر است(Azad and Al-Marzouk, 2008). علاوه بر این تغذیه بچه ماهیان تیلاپیا با *Bacillus amyloliquefaciens* جدا شده از روده سیم زرد باله موجب افزایش رشد و برخی از فراسنجه های ایمونولوژیکی این ماهی گردیده است (Ridha and Azad, 2012).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از مهم-ترین گونه‌های پرورشی رایج در کشور ما است و بخش عمده‌ای از تولیدات ماهیان گرمابی را به خود اختصاص می دهد. یکی از بزرگترین اهداف پیش رو در صنعت آبزی پروری کشور ما، یافتن راه حل‌هایی جهت بالا بردن میزان

تولید در واحد هکتار است. انجام تحقیقات بویژه در زمینه تغذیه این گونه ماهی می تواند در جهت بالا بردن میزان تولید و بازماندگی و در نهایت رسیدن به این هدف نزدیک‌تر کند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از روده ماهی شیربت و ارزیابی آن ها برای استفاده به عنوان جدایه های پروبیوتیکی در تغذیه ماهی کپور معمولی انجام شده است.

مواد و روش‌کار

ماهی ها و شرایط پرورشی

تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۴۰ گرم از یکی از استخرهای پرورشی در شوشتر با ظاهری سالم به طورتصادفی صید و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران منتقل شدند. پس از سازگاری بچه ماهیان با شرایط آزمایشی بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۶±۴۰ گرم به طور تصادفی در ۴ تیمار با ۳ تکرار در آکواریوم‌ها تقسیم بندی شدند. غذادهی سه بار در شبانه روز و در ساعت های ۸:۰۰، ۱۲:۰۰ و ۱۶:۰۰ و بر اساس توده زنده (۳٪ وزن بدن) انجام شد. میانگین درجه درجه حرارت آب ۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و طول دوره تغذیه با جیره‌های حاوی پروبیوتیک (*Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus bulgaricus* و *Lactobacillus casei*) ۶۰ روز بود. از روز ۶۰ تا ۷۵ (پایان دوره) ماهیان همه تیمارها با جیره‌ی بدون مکمل پروبیوتیکی (غذای تجاری) تغذیه شدند. تعویض آب روزانه و به میزان یک سوم آکواریوم‌ها صورت گرفت.

در این بررسی دو باکتری لاکتوباسیلوسی جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شیربت (پس از تعیین هویت به روش مولکولی) انتخاب و تکثیر گردیده و از نظر کارایی پروبیوتیکی با باکتری *Lactobacillus casei* (پروبیوتیک تجاری مرسوم، ATCC 1608) مورد مقایسه قرار گرفتند.

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

دو باکتری پروبیوتیک استفاده شده در این بررسی شامل microbiota جدا شده از روده ماهی شیربت بود. ماهیان سالم شیربت بیهوش (قطع ساقه نخاع) شده و برای رفع باکتری‌های سطح بدن نمونه های ماهی در محلول benzalkonium chloride ۰/۱ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفتند (Makridis *et al*., 2001) و سپس با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. سپس ناحیه شکمی ماهیان با استفاده از تیغ جراحی استریل شکافته و روده آن‌ها پس از جداسازی، به منظور همگن سازی به هاون چینی استریل منتقل شد. مقدار ۱ گرم از بافت همگن شده ی روده به ۹ میلیلیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد تا مخلوط همگن۱:۱۰ آن به دست آید. به همین ترتیب رقت‌های بر مبنای ده از نمونه ی اولیه تهیه گردید. بعد از مشخص شدن بهترین رقت، نمونه در محیط MRS آگار انتقال یافت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتیگراد در شرایط بی هوازی گرم خانه گذاری شده و سپس از پرگنه‌های مشکوک کشت فرعی تهیه شده و مراحل خالص سازی و شناسایی اولیه (رنگ آمیزی گرم، آزمایش های اکسیداز و کاتالاز) انجام گرفت. تعیین هویت مولکولی گونه های باکتریایی که از طریق آزمایشات (تحمل در برابر صفرا، تحمل نسبت به pH و ارزیابی فعالیت رقابتی) دارای بیشترین توان پروبیوتیکی بودند، با استفاده آزمایشات بیوشیمیایی (تخمیر قندها، آزمایش حرکت، رشد در دماهای مختلف) و تعیین توالی ژن RNASr ۱۶ (به روشPCR) صورت گرفت (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳).

آماده‌سازی مخلوط همگن باکتریایی

جهت آماده سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. به طور خلاصه هر کدام از باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط آبگوشت در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شستشو گردید و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند غلظت آن‌ها بر روی ۶×۱۰^{۷} CFU/ml تنظیم شد. هر کدام از پروبیوتیک‌ها با غلظت ۵×۱۰^{۷} CFU/ml بر روی غذا

اسپری گردید. همزمان بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد. سپس غذاها در محیط آزمایشگاه خشک گردید و تا زمان تغذیه ماهیان در فریزر نگهداری شدند. غذای تجاری (ساخت شرکت فرادانه) مورد استفاده حاوی ۴۷ درصد پروتئین، ۲۲ درصد چربی و ۸/۳ درصد خاکستر بود. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام شد. جهت شمارش رقت های 10^{-1} تا 10^{-7} باکتری تهیه شد. بدین منظور تعداد ۷ لوله آزمایش هر کدام حاوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل که از قبل آماده و شماره گذاری شده بود اقدام به تهیه رقت گردید بدین ترتیب مقدار ۱ میلی لیتر از محلول تهیه شده اولیه را به لوله اول اضافه نموده بخوبی تکان داده تا محتویات آن کاملا همگن شود که این لوله حاوی رقت 10^{-1} می باشد. سپس یک میلی لیتر از لوله اول را به لوله دوم انتقال داده و پس از انجام مراحل ذکر شده برای تمامی لوله ها انجام شد که در نهایت در لوله آخر رقت 10^{-7} بود. در ادامه رقت‌های مورد نظر آماده و بر روی محیط کشت MRS کشت داده شد و پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور تعداد باکتری ها بر حسب (Unit Forming-Colony) CFU ارزیابی شد.

شاخص‌های مورد بررسی

شاخص‌های رشد و تغذیه

برای مقایسه تغییرات رشد ماهیان بین تیمارها از شاخص‌های ضریب رشد ویژه (SGR)، میزان رشد نسبی (RGR)، ضریب تبدیل غذایی(FCR)، میزان رشد روزانه (DWG)، فاکتور وضعیت (CF)، نرخ بازدهی پروتئین (PER) و درصد بازماندگی با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید:

تعداد روزهای غذادهی/ ۱۰۰× (وزن اولیه Ln − وزن نهایی Ln) = میزان رشد ویژه

۱۰۰×(وزن اولیه / وزن اولیه − وزن نهایی) = میزان رشد نسبی

کل وزن تر کسب شده (گرم) / غذای دریافت شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

تعداد روزهای آزمایش / میانگین وزن اولیه − میانگین وزن نهایی = میزان رشد روزانه

^{3} [طول (سانتی متر)] / وزن نهایی (گرم) = فاکتور وضعیت

پروتئین مصرفی (گرم) /وزن تر تولید شده (گرم) = نرخ بازدهی پروتئین

۱۰۰× تعداد ماهیان اولیه / تعداد ماهیان زنده مانده در پایان آزمایش = درصد بازماندگی

فلور باکتریایی روده

برای این منظور از دستگاه گوارش ماهیان (۳ قطعه از هر تکرار)، در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ نمونه‌گیری شد. برای نمونه گیری ابتدا ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری تغذیه ماهیان قطع شد، ماهی‌ها به روش قطع نخاع کشته شده. سپس سطح پشتی و شکمی آن‌ها با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و حفره ی شکمی با استفاده از چاقوی جراحی استریل بازو دستگاه گوارش ماهیان جداسازی گردید. روده در حد فاصل بعد از مری و ۰/۵ سانتی‌متر مانده به مخرج قطع شده، محتویات رودهای با مالش ملایم چاقوی جراحی خارج گردید. یک گرم از این محتویات روده در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی رقیق شد و از نمونه فوق، رقت‌های متوالی 10^{-2} تا 10^{-7}تهیه گردید و به صورت سطحی در محیط کشت MRS Agar و TSA به ترتیب برای شمارش Lactobacillus ها و شمارش کلی کشت داده شد. پلیت‌های MRS به مدت ۴۸ ساعت در دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی قرار داد شدند. پس از گرمخانه گذاری، پرگنه ها شمارش شده و تعداد کل باکتری‌ها با احتساب رقت مورد استفاده مشخص گردید (Mahious و همکاران، ۲۰۰۶).

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

جهت انجام آزمون های آماری ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov–Smirnov و یکنواختی

variance ها با آزمون همبستگی Leven بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One- Way ANOVA) و نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد، به این صورت که فاکتور ها یکبار بر اساس زمان و یکبار بر اساس گروه‌ها آنالیز گردیدند. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت. آنالیز واریانس دو طرفه(Two- Way ANOVA) جهت بررسی دو عامل زمان وگونه باکتری پروبیوتیکی بر شاخص‌های مختلف رشد و فلور باکتریایی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

شاخص‌های رشد و تغذیه‌ای

نتایج حاصل از بررسی اثر باکتری های لاکتوباسیلوسی جدا سازی شده از روده ماهی شیربت و پروبیوتیک تجاری (*Lactobacillus casei*) در دوره‌های مختلف بر معیارهای رشد (شاخص‌های ضریب رشد ویژه، میزان رشد نسبی، ضریب تبدیل غذایی، بازدهی پروتئین، میزان رشد روزانه، فاکتور وضعیت و درصد بازماندگی) در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با تیمارهای پروبیوتیکی مختلف در جدول ۱ آورده شده است. شاخص فاکتور وضعیت در سه دوره نمونه برداری (روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵) بین تیمارهای پروبیوتیکی مختلف و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

ضریب رشد ویژه در روز ۳۰ و۶۰ به طور معنی داری تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$). هرچند این شاخص در روز ۷۵ در تیمار *L.bulgaricus* نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). شاخص افزایش رشد نسبی در روز ۳۰ و ۷۵ آزمایش بین تیمارهای پروبیوتیکی مختلف اختلاف معنی داری نداشت، اما در روز ۷۵ این شاخص در بچه ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *Lactobacillus casei* نسبت به شاهد به طور معنی داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$).

آنالیز آماری نتایج ضریب تبدیل غذایی در تیماهای مختلف نشان داد این شاخص در روز۳۰ ام تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار نگرفته است ($p>۰/۰۵$). با این حال در روزهای ۶۰ و ۷۵ این شاخص در بچه ماهیان تغذیه شده با باکتری *Lactobacillus casei* بطور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد پایین تر است ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱)، با این حال ضریب تبدیل غذای تیمارهای تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک اختلاف معنی داری ندارند ($p>۰/۰۵$).

شاخص بازدهی پروتئین در روز ۳۰ به طور معنی داری تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار گرفت، به طوری که بالاترین میزان بازدهی پروتئین در تیمار *Lactobacillus casei* مشاهده شد و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). این فاکتور در روزهای ۶۰ و ۷۵ تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۱).

نتایج مربوط به ضریب رشد نسبی در ماهی های کپور تغذیه شده با تیمارهای مختلف پروبیوتیکی در روز۳۰ و۶۰ و ۷۵ نمونه گیری با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p<۰/۰۵$). با این حال مقایسه آماری این شاخص در تیمار *Lactobacillus bulgaricus* و تیمار *Lactobacillus plantarum* نشان داد این شاخص درروز ۳۰ و ۷۵، همچنین در تیمار *Lactobacillus casei* بین روز ۳۰ و۶۰ با روز ۷۵ اختلاف معنی داری وجود دارد($p<۰/۰۵$).

درصد افزایش وزن در روز۳۰ و ۶۰ تحت تأثیر تیمارهای پروبیوتیکی قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$). اما در روز ۷۵ این شاخص در بچه ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *L.bulgaricus* اختلاف معنی‌داری با بچه ماهبان با جیره فاقد پروبیوتکی (شاهد) نشان دادند ($p<۰/۰۵$). بطوریکه بچه ماهبان تیمار *L.bulgaricus* بالاترین درصد افزایش وزن را در بین تیمارهای پروبیوتیکی داشتند ($p<۰/۰۵$). درخصوص تغییرات این شاخص در زمان‌های مختلف نمونه برداری، در تیمار *L.bulgaricus* و تیمار *L. plantarum* بین روز ۳۰ و ۷۵ نمونه گیری اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

در طی آزمایش هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد و درصد بازماندگی در تمامی تیمارها ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۱: شاخص‌های رشد و تغذیه ای ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با تیمارهای مختلف در روزهای مختلف نمونه‌گیری (نتایج بر اساس Means±SD گزارش شده‌اند).

شاخص[1]	تیمار پروبیوتکی	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
فاکتور وضعیت	*L.bulgaricus*	۱/۳۲±۰/۱۲^{aA}	۱/۳۲±۰/۰۷^{aA}	۱/۲۹±۰/۰۸^{aA}
	L. plantarum	۱/۳۲±۰/۰۰ ^{aA}	۱/۳۰±۰/۰۵^{aA}	۱/۳۳±۰/۲۰^{aA}
	L. casei	۱/۳۳±۰/۰۴^{aA}	۱/۳۲±۰/۰۲^{aA}	۱/۲۴±۰/۰۷^{aA}
	شاهد	۱/۳۷±۰/۱۰^{aA}	۱/۳۶±۰/۰۳^{aA}	۱/۳۰±۰/۰۵^{aA}
ضریب رشد ویژه	*L.bulgaricus*	۰/۱۴±۰/۰۵^{aA}	۰/۱۰±۰/۰۲^{aA}	۰/۱۲±۰/۰۱^{aA}
	L. plantarum	۰/۱۲±۰/۰۲^{aA}	۰/۰۹±۰/۰۲^{aA}	۰/۱۱±۰/۰۲^{abA}
	L. casei	۰/۱۳±۰/۰۴^{aA}	۰/۱۳±۰/۰۲^{aA}	۰/۱۰±۰/۰۰^{abA}
	شاهد	۰/۱۰±۰/۰۳^{aA}	۰/۱۰±۰/۰۲^{aA}	۰/۰۹±۰/۰۲^{bA}
افزایش رشد نسبی	*L.bulgaricus*	۰/۱۸±۰/۰۴^{abA}	۰/۱۷±۰/۰۴^{aA}	۰/۲۲±۰/۰۳^{abA}
	L. plantarum	۰/۱۸±۰/۰۳^{abA}	۰/۱۶±۰/۰۴^{aA}	۰/۲۱±۰/۰۳^{abA}
	L. casei	۰/۲۴±۰/۰۲^{aA}	۰/۲۱±۰/۰۵^{aA}	۰/۲۵±۰/۰۳^{aA}
	شاهد	۰/۱۷±۰/۰۳^{bA}	۰/۱۵±۰/۰۲^{aA}	۰/۱۹±۰/۰۲^{bA}
ضریب تبدیل غذایی	*L.bulgaricus*	۲/۴۳±۰/۴۶ ^{aA}	۲/۸۸±۰/۴۳ ^{abA}	۲/۹۰±۰/۳۷^{abA}
	L. plantarum	۲/۸۰±۱/۱۱ ^{aA}	۲/۹۹±۰/۵۰^{abA}	۲/۹۸±۰/۳۷^{abA}
	L. casei	۲/۴۰±۰/۴۲ ^{aA}	۲/۵۳±۰/۵۱^{bA}	۲/۵۲ ±۰/۳۰^{bA}
	شاهد	۳/۲۷±۰/۴۵ ^{aA}	۳/۷۵±۰/۸۵^{aA}	۳/۳۰±۰/۳۵^{aA}
بازدهی پروتئین	*L.bulgaricus*	۱/۳۴±۰/۳۱^{abA}	۱/۲۷±۰/۱۳^{aA}	۱/۳۱±۰/۱۸^{aA}
	L. plantarum	۱/۳۷±۰/۲۲^{abA}	۱/۲۷±۰/۲۴^{aA}	۱/۲۷±۰/۱۶^{aA}
	L. casei	۱/۷۷±۰/۱۹^{aA}	۱/۵۱±۰/۱۲^{aAB}	۱/۴۴ ±۰/۱۵^{aB}
	شاهد	۱/۲۴±۰/۱۸^{bA}	۱/۱۸±۰/۱۹^{aA}	۱/۱۶±۰/۰۵^{aA}
ضریب رشد نسبی	*L.bulgaricus*	۱۰/۳۴±۳/۸۶^{aA}	۸/۳۸±۰/۵۰^{aAB}	۴/۱۴±۰/۴۱^{aB}
	L. plantarum	۸/۸۹±۱/۶۵^{aA}	۶/۲۷±۱/۶۳^{aAB}	۳/۹۰±۰/۶۱^{aB}
	L. casei	۹/۳۲±۲/۹۰^{aA}	۸/۶۵±۱/۰۷^{aA}	۳/۶۷±۰/۵۶^{aB}
	شاهد	۷/۴۸±۱/۹۷^{aA}	۶/۸۸±۱/۱۴^{aA}	۳/۱۳±۰/۷۰^{aB}
درصد افزایش وزن	*L.bulgaricus*	۱۰/۳۴±۳/۸۶^{aA}	۷/۳۳±۱/۵۰^{aAB}	۴/۴۶±۰/۵۱^{aB}
	L. plantarum	۸/۸۹±۱/۶۵^{aA}	۶/۲۷±۱/۶۳^{aAB}	۳/۹۰±۰/۶۱^{abB}
	L. casei	۹/۳۲±۲/۹۰^{aA}	۹/۱۷±۱/۵۸^{aA}	۳/۳۶±۰/۰۵^{abB}
	شاهد	۷/۴۸±۱/۹۷^{bA}	۶/۸۸±۱/۱۴^{aA}	۳/۱۳±۰/۷۰^{bB}

۱- حروف کوچک لاتین غیر یکسان نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد در هر ستون و حروف بزرگ لاتین غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد در هر ردیف می‌باشد.

ارزیابی باکتریایی روده

تعداد کل باکتری‌ها و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بافت روده ماهیان کپور معمولی در جدول ۲ آورده شده است. شمارش کلی باکتری‌های محتوی روده نشان داد در روزهای ۳۰ و ۷۵ اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بطوریکه در روز ۳۰ تعداد کل باکتری ها در تیمار *L. casei* و شاهد نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود. در روز ۶۰ آزمایش تیمارهای کازئی و *L.bulgaricus* بالاترین میزان باکتری های کل را به خود اختصاص دادند ($p<۰/۰۵$). بررسی نتایج حاصل از آزمایشات باکتریایی در روز ۷۵ دوره پرورش، نشان داد میزان باکتری‌های دستگاه گوارش ولاکتوباسیلوس ها، پس از قطع پروبیوتیک کاهش می‌یابد اما میزان تیمارهای پروبیوتیکی بیشتر از گروه شاهد بود. نتایج شمارش کلی باکتری‌های محتوی روده نشان داد در تیمارهای پروبیوتیکی (*L.bulgaricus*، *L.lantarum* و *L. casei*) بین روز صفر نمونه گیری با روز ۳۰، ۶۰ و ۷۵ اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد کل باکتری‌ها و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بافت روده ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با تیمارهای مختلف پروبیوتیکی (Means ±SD).

آزمایشات باکتریایی[1]	تیمار	روز ۰	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (×۱۰^{۲}CFU)	*L.bulgaricus*	۱۱±۳/۵۱^{aB}	۶۳±۳/۲۱^{aA}	۵۵/۶۶±۱/۵۲^{aA}	۹±۱/۵۲^{aB}
	L.plantarum	۸±۳^{aB}	۴۹±۷^{bA}	۴۲±۵^{bA}	۷/۳۳±۱/۵۲^{aB}
	L. casei	۱۰±۲/۱^{aB}	۶۵±۹/۳^{aA}	۵۳±۳^{aA}	۱۲±۱^{aB}
	شاهد	۶±۳۰/۸^{aA}	۱۱±۸/۶۶^{cA}	۱۱±۵^{cA}	۸/۶۶±۳^{aA}
تعداد کل باکتری‌های روده (×۱۰^{۸} CFU)	*L.bulgaricus*	۴۱۶/۷±۱۰/۴^{aA}	۲۵۵/۳۳±۴/۷^{bB}	۲۲۲±۳/۶^{aB}	۲۷۲±۵^{aB}
	L.plantarum	۴۱۶/۷±۷۶/۳^{aA}	/۶۶±۱۲/۵^{bB} ۲۲۱	۲۱۷±۲^{aB}	۲۰۲/۶۶±۳/۱^{cB}
	L. casei	۴۲۰±۴^{aA}	۲۲۸/۳۳±۱۰^{aB}	۲۱۰±۴^{aB}	۲۴۹/۳۳±۱۰/۵^{aB}
	شاهد	۴۰۳/۳۳±۶۱/۱^{aA}	۲۹۱/۳۳±۵^{aB}	۲۱۹±۷^{aB}	۲۴۱/۶۶±۵^{bB}

۱-حروف غیرهمنام کوچک در هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در میان تیمارها در یک مرحله از نمونه‌گیری ($p<۰/۰۵$) و حروف غیر همنام بزرگ در هر ردیف نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در روزهای مختلف نمونه‌گیری برای هر تیمار می باشند.

بحث

در طی سال های اخیر استفاده از مواد افزودنی در خوراک دام، طیور و آبزیان به شدت مورد توجه متخصصین تغذیه علوم دامی و آبزی پروری واقع شده است. یکی از مهم ترین این افزودنی ها، محصولات میکروبی است که به طور زنده و مستقیم در جیره به مصرف می رسد و در تجارت به نام پروبیوتیک شناخته شده اند. بیشترین باکتری‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در آبزی‌پروری متعلق به جنس-

های LAB (مانند lactobacillus و carnobacterium)، ویبریو (*Vibrio alginolyticus*)، باسیلوس و سودوموناس می‌باشند (Verschuere *et al*., 2000; Irianto & Austin, 2002; Nakano, 2003, 2006; Burr and Gatlin, 2005). در کپور ماهیان، به علت اسیدی نبودن دستگاه گوارش، توان تحمل اسید در ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی، رتبه سوم پس از قدرت مهار کنندگی و تحمل صفرا قرار می‌گیرد. در این مطالعه باکتری *L. plantarum* و *L.bolgaricus* دارای پتانسیل پروبیوتیکی از میان جدایه‌های لاکتوباسیلی بوده و می-توانند به صورت مکمل پروبیوتیکی به غذای آبزیان اضافه گردد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از باکتری های پروبیوتیکی جدا شده از روده ماهی شیربت عملکرد رشد ماهی کپور معمولی را بهبود می‌بخشد. مقایسه شاخص-های رشد در روزهای مختلف نمونه برداری نشان می دهد بیشتر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش تغییرات معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف ندارند. اما در روز ۷۵ آزمایش، شاخص هایی مانند ضریب چاقی، افزایش رشد نسبی و ضریب رشد ویژه در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ها نبست به تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافته است. این موضوع نشان می دهد اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در افزایش رشد روند کوتاه مدت نبوده و این باکتری ها باید فرصت کافی برای رقابت با سایر میکروارگانیسم های دستگاه گوارش و بروز اثرات مثبت خود داشته باشند. اثرات مثبت مکمل های پروبیوتکی جیره در بهبود رشد آبزیان در مطالعات متعددی گزارش شده است (Merrifield and Ringo, 2014). Navinchandran و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیق خود عنوان نمودند که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *Bacillus cereus* جدا شده از روده میگوی مونودون (*Penaeus monodon*) دارای عملکرد رشد، بازماندگی، ضریب رشد ویژه وضریب تبدیل غذایی بالاتری نسبت به گروه شاهد هستند. آنها این افزایش فاکتورهای رشد را به عملکرد باکتریهای پروبیوتیکی درتولید آنزیم های گوارشی ومواد مغذی مورد نیاز رشد مثل ویتامین ها و اسیدهای آمینه نسبت دادند. در تحقیقی مشابه جعفریان و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند مخلوطی از باکتری های باسیلوسی و مخمر ساکارومایسیس(*Saccharomyces cerevisiae*) جدا شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*) موجب بهبود پارامترهای رشد و تغذیه در لارو ماهی کپور نقرهای (*Hypophthalmichthys molitrix*) می گردد. .بررسی ها نشان می دهد پروبیوتیک‌ها با بهبود تغذیه میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی و مکمل‌های رشد، جلوگیری از اختلالات روده‌ای و پیش هضم مواد مغذی موجود در جیره باعث بروز اثرات مثبت دردر موجودات زنده زنده می شوند. همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق سم‌زدایی ترکیبات مضر موجود در جیره به وسیله هیدرولیز آنزیمی و تولید ویتامین‌هایی مانند بیوتین و ویتامین B12 تغذیه را بهبود بخشند (Merrifield and Ringo, 2014). علاوه بر این بسیاری از گونه‌های باکتری لاکتوباسیلوسی موجود در روده ماهیان قادر به تولید ترکیبات بازدارنده مانند باکتریوسین‌های پپتیدی ضد قارچ، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی هستند، که بر روی عوامل بیماری زا عمل می‌کنند. (Burr and Gatlin, 2005; Vine *et al*., 2006). همچنین موتیف‌های DNA باکتری‌ها پاسخ‌های ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند (Tassakka and Sakai, 2003).

نتایج این بررسی نشان داد درصد بازماندگی در همه تیمارها ۱۰۰ درصد است و هیچ گونه مرگ و میری در طول دوره آزمایش مشاهده نشد. این نتایج با نتایج Hernandez و همکاران (۲۰۱۰) مشابه می‌باشد. همچنین در مطالعه دیگری Suzer و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند استفاده از پروبیوتیک تجاری لاکتوباسیلوس تاثیر معنی داری بر بازماندگی لارو ماهی شانک طلایی (*Sparus auratus*) ندارد. در این مطالعه ضریب تبدیل غذایی در ماهیان کپور تغذیه شده با جیره شاهد بویژه در روز ۳۰ و ۷۵ نمونه برداری بالاتر بود. همچنین بازده پروتئین نیز در این گروه از بچه ماهیان در روزهای ۳۰ و ۶۰ به طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. از آنجا که میزان پروتئین جیره های ازمایش مورد

استفاده در این بررسی یکسان بوده است، بنابراین می‌توان گفت احتمالا استفاده از مکمل غذایی پروبیوتیک در جیره نقش مثبتی در افزایش بازدهی پروتئین مصرفی و در نهایت ضریب تبدیل غذایی داشته است.

نتایج شمارش باکتری‌های روده در این بررسی نشان تعداد باکتری های اسید لاکتیکی در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش در بچه ماهیان تغذیه شده با هر سه باکتری نسبت به شروع آزمایش به طور معنی داری افزایش یافته است. همچنین مقایسه بین گروهی تیمارها در این دو زمان نشان داد تعداد این باکتری ها به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد بالاتر است. این نتایج نشان میدهد این باکتری ها می‌توانند در دستگاه گوارش ماهی کپور زنده بمانند و همچنین توانسته‌اند به خوبی به سطح مخاطی روده ماهیان مورد آزمایش چسبیده و تکثیر کنند. اکثر باکتری‌هایی که دارای خواص پروبیوتیکی در انسان و سایر حیوانات خشکی زی هستند، از توانایی خوبی جهت اتصال به سطوح مخاطی آبزیان نیز برخوردار می‌باشند. بطور مثال Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی خود نشان دادند برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس از توانایی خوبی جهت اتصال به سطوح مخاطی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار هستند. از سوی دیگر نتایج این بررسی نشان داد چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک به سطوح مخاطی روده ماهی مختص به گونه خاصی نیست و همه گونه های مورد استفاده در ای مطالعه از این توانایی برخودار بودند. این ویژگی سبب می‌شود تا باکتری پروبیوتیک با بلوکه کردن گیرنده‌های اتصال، رقابت برای مواد مغذی و تولید مواد ضدمیکروبی از تهاجم عوامل بیماری‌زا در میزبان جلوگیری نماید (Servin، ۲۰۰۴). Pirarat و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود عنوان نمودند ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک، دارای ریزپرزهای طویل‌تری نسبت به گروه کنترل هستند و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و در نهایت باعث افزایش جذب می‌شود (Caspary، ۱۹۹۲). همچنین پروبیوتیک‌ها باعث تحریک تکثیر سلول‌های پوششی دستگاه گوارش می‌شوند (Ichikawa و همکاران، ۱۹۹۹). پروبیوتیک‌ها پس از رسیدن به روده شروع به تکثیر کرده و از قندها جهت رشد خود و تولید مواد سازنده‌ی اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه استفاده می‌کنند. این اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریزپرزهای روده دارند (Pelicano و همکاران، ۲۰۰۵)، چرا که اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه بخصوص بیوتریک اسید (butyric acid) به عنوان اصلی‌ترین منبع انرژی برای سلول‌های پوششی روده محسوب می‌شوند. همچنین بیوتریک اسید می‌تواند باعث آزادسازی پپتیدهای روده‌ای و فاکتورهای رشدی شوند که در تکثیر سلول‌های پوششی موثرند (Blottiere و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش همزمان تعداد باکتری های اسید لاکتیکی و بهبود فاکتورهای رشد و تغذیه در تیمارهای تغذیه شده با باکتری‌های پروبیوتیکی در این مطالعه می تواند نشان دهنده تاثیر مثبت این باکتری‌ها در تغییر فلور میکروبی و در نهایت بروز سایر اثرات سودمند این باکتری ها باشد. بر خلاف باکتری های اسید لاکتیکی، تعداد کل باکتری های روده در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ نسبت به شروع آزمایش به طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش ممکن است به دلیل معرفی پروبیوتیک‌ها و تغییر قابل ملاحظه در نسبت باکتری‌های موجود در فلور روده و محدود شدن سایر باکتری‌ها (به خصوص باکتری‌های مضر) توسط پروبیوتیک‌ها باشد. باکتری‌های لاکتوباسیلوس، از طریق تولید bacteriocin رشد عوامل بیماری زای خاصی در ماهی جلوگیری می‌کنند، بنابراین اثرات مثبتی در microflora میزبان دارند (Ringo و Gatesoup، ۱۹۹۸).

به نظر می‌رسد باکتری‌های لاکتوباسیلوس Lactobacillus، plantarum *L.bulgaricus* جدا شده از روده ماهی شیربت و *L. casei* احتمالا با ایجاد اثرات مثبت در قابلیت هضم و جذب مواد مغذی جیره باعث افزایش شاخص های تغذیه ای و رشد ماهی کپور معمولی می گردند. با توجه به نتایج این تحقیق این باکتری ها توانایی زنده ماندن در دستگاه گوارش و قابلیت اتصال به مخاط دیوار روده این ماهی را دارد و می‌توانند غالبیت فلور باکتری های دستگاه گوارش را به سمت باکتری های مفید سوق دهند. در مجموع می توان گفت

باکتری های مورد استفاده در این مطالعه می توانند به عنوان پروبیوتیک در جیره ماهی کپور معمولی مورد استفاده قرار گیرد و باعث بهبود و تعادل میکروفلور روده و در نهایت به حفظ سلامت آبزی کمک کنند. انجام مطالعات بیشتر مثل فعالیت آنزیم گوارشی و بافت شناسی روده می تواند جهت روشن شدن مکانیسم اثرگذاری این باکترهای بر سلامتی این گونه کمک کند.

منابع

جعفریان، ح.، خسروی، خ.، عبداللهی، د. و توانا، ی.، ۱۳۹۳. تاثیر مخلوط باسیلوس ها (*Bacillus* spp.) و مخمر ساکارومایسس سرویزیای (*Saccharomyces cerevisiae*) جدا شده از روده فیل ماهی (*Huso huso*) بر پارامترهای رشد و تغذیه در لارو ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*). فصلنامه تغذیه و بیوشیمی آبزیان. شماره ۲. صفحات ۱-۱۲.

ضیایی نژاد، س.، رفیعی، م.، میرواقفی، ع. و فرحمند، ح. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در شاخص های رشد، بازماندگی و فلور میکروبی دستگاه گوارش لارو ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) با شیوه‌های رسانش مختلف. نشریه شیلات، صفحات ۲۸۷-۲۹۸.

محمدیان، ت.، قربانپور، م.، علیشاهی، م.، تابنده، م و غریبی، د. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت. مجله دامپزشکی ایران، صفحات ۸۸-۹۷.

Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish (4th edn). SpringerPraxis, Chichester, UK.

Azad, I.S. and Al-Marzouk, A., 2008. Autochthonous aquaculture Probiotics-A critical analysis. Proceeding of the 1st International Society of Biotechnology Conference. pp. 171–177.

Blottiere, H.M., Buecher, B., Galmiche, J.P. and Cherbut, C., 2007. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 101–106.

Burr, G. and Gatlin III, D.M., 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: 425–436.

Caspary, W.F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. American Journal of Clinical Nutrition, 55: 299S.

Fuller, R., 1992. History and development of probiotics. In: Probiotics: The Scientific Basis, Vol. 232 (ed. by R. Fuller), pp.1-18. Chapman & Hall, London, UK.

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

Gongora, C.M., 1998. Mecanismos de resistencia bacteriana ante la medicina actual. McGraw-Hill, Barcelona, 456 pp.

Hernandez, L.H.H., Barrera, J.C., Mejia, G.C., Del Carmen, M., Dosta, M., Lara, D.E., Andrade, R. and Sotres, J.A.M., 2010. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistanc of Aquaculture Nutrition, 16: 407-411.

Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Shenavar Masooleh, A. and Esteban, M.Á., 2014.

Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture, *Accepted*. doi: 10.1111/raq.12082.

Ichikawa, H., Kuroiwa, T. Inagaki, A., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S. and Sakata, T., 1999. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Digestive Diseases and Sciences, 44: 2119–2123.

Irianto, A. and Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases**,** 25: 333–342.

Klaenhammer, T.D. and Kullen, M.J., 1999. Selectionand design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50: 45-57.

Lara-Flores, F.M., Olvera, N.M.A., Guzman, M.B.E. and Lopez, M.W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus fecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cereviseae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 216: 193–201.

Lee, C.S., Lim, C., Gatlin, D.M. and Webster, C.D., 2015. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 382 p.

Makridis, P., Bergh, Q., Skjermoj, J. and Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in Artemia metanauplii to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International, 9: 225-235.

Mahious, A.S., Gatesoupe., F.J. Hervi., Metailler., M.R. and Ollevier. F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). Aquaculture International, 14(3): 219-229.

Merrifield, D. and Ringo, E., 2014. Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics, and prebiotics. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.

Nakano, T., 2003. Microorganisms. In: Nakagawa, H. and Sato, M. (eds) Micronutrients and Health of Cultured Fish. Koseisha Koseikaku, Tokyo, pp. 95–106.

Nakano, T., 2006. The function of probiotics and its application for aquaculture. Yoshoku, 43(7): 72–76.

Navinchandran, M.., Iyapparaj., P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G. and Palavesam, A., 2013. Influence of probiotic bacterium *Bacillus ceveus* isolated from gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P.monodon*. Fish and shellfish Immunology, 36(1): 38-45.

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

Pelicano, E.R.L., Souza, P.A., Souza, H.B.A., Figueiredo, D.F., Boiago, M.M., Carvalho, S.R. and Bordon. V.F., 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. RevistaBrasileira de CienciaAccola, 7: 221–229.

Pirarat, N., Pinpimai, K. Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N. and Maita, M.., 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in Veterinary Science, 91: 92–97.

Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez M.P. and Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240: 313-329.

Ridha, M.T. and Azad, I.S., 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquaculture Research, 43: 843–852.

Ringo, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160:177-203.

Saenz de Rodriganez, M., Dıaz-Rosales, P., Chabrillon, M., Smidt, H., Arijo, S., Leon-Rubio, J.M., Alarcon, F.J., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Cara, J.B. and Moyano, F.J., 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*. Kaup, 1858). Aquaculture Nutrition, 15: 177–185.

Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews, 28: 405-440.

Sissons, J.W., 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. Journal of Science Food and Agriculture, 49: 1-13.

Soccol, C., Porto, L. and Rigon, M., 2010. The potential of probiotics: a review. Food Technology & Biotechnology, 48: 413–434.

SOFIA., 2014. The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and aquaculture Department, Rome.

Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, S., Firat, K. and Otgucuoğlu, Ö., 2008. *Lactobacillus* spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata, L.*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280: 140-5.

Tassakka, A.C., Savan, R., Watanuki, H. and Sakai, M., 2003. The *in vitro* effect of CpG-ODNs on the innate immune responses of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture, 220: 27–36.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 655–671.

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T., 2004.

Competition for attachment of aquaculrue candidate probiotic and pathogenic bacaetia on fish interstinal mucus. Journal of fish disease, 27: 319-326.

Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiogical Reviews, 30: 404–427.

Yanbo, W. and Zirong, X., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127: 283–292.

The effect of isolated Lactobacillus from gut of *Barbus grypus* on growth performance, survival and gut microflora of common carp (*Cyprinus carpio*)

Hosseini A.[1]; Chaharlang F.[1]; Sotoudeh E.[1]*; Alishahi M.[2]; Modaresi M.[3]

*e.sotoudeh@yahoo.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran .

2-Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

3- Department of Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

Abstract

This study evaluated the impact of dietary supplementation bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus* isolated from the intestine of *Barbus grypus* on growth performance, survival and intestinal flora of common carp. For this purpose 480 common carp (average initial weight of 40 ± 6g) were randomly divided to 4 treatments (with three replications) and fed with diet containing 5×107 CFU/g *L.plantarum* (Group 1), *L.bulgaricus* (Group 2), *Lactobacillus casei* (Group3) and a diet without probiotic supplementation (As control group) for 60 days. To evaluate the persistent of the bacteria in digestive system, from the 60 th day to75 th day, experimental fish were fed with diet without probiotics (control). Results showed that Specific growth rate of fish fed diets containing Lactobacillus significantly higher compared with control group (p<0.05). Fish fed diets containing *L.casei* had significantly lower FCR than the control group on 60 th and 75 th of trial (p<0.05). The protein efficiency ratio and specific growth rate of fish fed the isolated bacteria at different times of trial was higher compared to fish fed than control diet. In general, results of intestinal micro flora assessment showed that Lactobacillus bacteria significantly increased in fish fed with dietary probiotic at 30 and 60 of trial (p<0.05) and groups 2 and 3 showed the greatest amount of Lactobacillus compared to the control group after 30 days of feeding. The results of this study showed that the addition of lactobacillus bacteria isolated from the intestines of *Barbus grypus* in the diet of common carp increased the beneficial micro flora population of intestinal microflora and ultimately improved growth performance and feed utilization.

Keywords: Probiotic, Growth, Microflora, Common carp, *Barbus grypus*

---

*Corresponding author