University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 2, 2020, pages: 13-25

Effects of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 probiotics on blood parameters and body composition of rainbow trout

Amir Veisi[1], Hossein Ouraji[*1], Farid Firouzbakhsh[1], Gholamreza Rafiee[2], Abdolsamad Keramat[1]

1- Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

2- Department of Fisheries, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Faculty of Natural Resources, Karaj, Alborz, Iran

Received 04 April 2019 accepted 30 June 2020

KEYWORDS

Aquaculture

Nutrition

Sodium alginate

Chitosan

Immunity

ABSTRACT

Effects of the microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 on the blood parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In this study, first the probiotic bacteria *L. rhamnosus* JCM 1136 were microencapsulated with coatings of sodium alginate and chitosan. Then, they were added to the food pellets and given to the fingerlings. For this purpose, 225 rainbow trout fingerlings (6.23 ± 0.17 g) in 5 treatments and each treatment with 3 replications were placed in California trays (220 × 30 × 15 cm). Treatment 1 (T1): Fish fed with 10^8 CFU/g microencapsulated probiotics with sodium alginate, treatment 2 (T2): fish fed with 10^8 CFU/g microencapsulated probiotics with sodium alginate and chitosan, treatment 3 (T3): fish fed with 10^8 CFU/g capsule-free probiotics, treatment 4 (T4): fish fed with probiotic-free sodium alginate–chitosan capsules and control treatment 5 (T5): fish fed with commercial free-probiotic and capsules pellets. At the end of the course, results indicated that the fishes fed with diet containing sodium alginate-chitosan microencapsulated probiotics in terms of blood parameters such as red blood cells, white blood cells, hemoglobin and hematocrit as well as the amount of carcass protein compared to control and other treatments were in better condition, which These differences were significant with control treatments fishes ($p<0.05$).

*Corresponding author: hoseinoraji@yahoo.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال ششم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۲۵-۱۳

"مقاله پژوهشی"

اثرات پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 ریزپوشانی شده بر فراسنجه‌های خونی و ترکیب شیمیایی لاشه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

امیر ویسی[۱]، حسین اورجی*[۱]، فرید فیروز بخش[۱]، غلامرضا رفیعی[۲]، عبدالصمد کرامت[۱]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۱۰

چکیده

در این پژوهش ابتدا باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus JCM 1136* به وسیله پوششی از جنس آلژینات سدیم و کیتوزان مورد ریزپوشانی قرار گرفت. سپس، به پلت‌های غذایی افزوده و در اختیار بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان قرار داده شدند. به این منظور، تعداد ۲۲۵ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (۰/۱۷ ± ۶/۲۳ گرم) در قالب ۵ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در تراف‌های کالیفرنیایی به ابعاد cm ۱۵ × ۳۰ × ۲۲۰ قرار گرفتند. تیمار اول (T_1): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم تغذیه شدند. تیمار دوم (T_2): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان تغذیه شدند. تیمار سوم (T_3): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول تغذیه شدند. تیمار چهارم (T_4): ماهیانی که با کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم-کیتوزان فاقد پروبیوتیک تغذیه شدند و تیمار شاهد (T_5): که با پلت‌های تجاری فاقد کپسول و پروبیوتیک تغذیه شدند. در پایان دوره، نتایج نشان داد ماهیانی که در جیره غذایی آن‌ها از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان استفاده شده بود از نظر فراسنجه‌های خونی مانند گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، هموگلوبین و هماتوکریت و نیز میزان پروتئین لاشه نسبت به ماهیان تیمار کنترل و دیگر تیمارها در شرایط بهتری بودند که این تفاوت‌ها با ماهیان تیمار کنترل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی

آبزی‌پروری

تغذیه

آلژینات سدیم

کیتوزان

ایمنی

نویسنده مسئول: hoseinoraji@yahoo.com

مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی صنعت آبزی پروری موضوع بیماری‌های آبزیان می‌باشد. به طوری که سالانه میلیون‌ها دلار به این صنعت خسارت وارد می‌کند (ذریه زهرا و عادل، ۱۳۹۵). با توجه به مضرات و محدودیت‌های استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری از قبیل تجمع این مواد در پیکره آبزیان و ایجاد مقاومت دارویی در آن‌ها، انتقال این مواد به انسان‌ها و اثرات سویی که بر جامعه میکروبی دستگاه گوارش می‌گذارند (Zilberg et al. 2010; Peredo et al. 2015)، در سال‌های اخیر توجه بیشتری بر استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به عنوان یک استراتژی موثر و پایدار به منظور بهبود توان مقابله با بیماری‌ها ایجاد گردیده است (Chen et al. 2020). در این بین یکی از انواع باکتری‌های پروبیوتیک که بیشترین استفاده را در آبزی‌پروری دارند لاکتوباسیلوس‌ها هستند (Nayak, 2010). لاکتوباسیل‌ها باکتری‌های گرم مثبت و میله‌ای شکل هستند که تنفس بی‌هوازی اختیاری دارند (Ramos et al. 2013). گونه *L. rhamnosus* یکی از انواع لاکتوباسیلوس‌ها است که نقش مثبت استفاده از آن بر رشد و ایمنی آبزیان پیش از این به اثبات رسیده است (Nikoskelainen et al. 2003; Panigrahi et al. 2010; Pirarat et al. 2015). با این حال یک مشکل عمده در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری وجود دارد و آن تحمل نسبتا پائین این ارگانیسم‌ها در مقابل شرایط اسیدی معده و آنزیم‌های صفراوی و کاهش میزان زنده‌مانی آن‌ها از مرحله انبار تا رسیدن به روده میزبان است و همین عامل باعث می‌شود که پروبیوتیک‌ها در روده کارایی لازم و قابل انتظار را نداشته باشند (Kailasapathy, 2008; Pinpimai et al. 2015)، به همین دلیل محققان در طی سال‌های اخیر همواره به دنبال یافتن راهی برای محافظت از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط نامساعد دستگاه گوارش میزبان بوده‌اند. یکی از جدیدترین روش‌ها برای افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها، روش ریزپوشانی است. ریزپوشانی فرآیندی است که در آن سلول‌ها در یک بافت یا غشای کپسول‌دار نگهداری می‌شوند. در میان تمام روش‌هایی که برای افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها اندیشیده شده است، تکنیک ریزپوشانی به دلیل تضمین زنده‌مانی باکتری‌ها در دستگاه گوارش میزبان و فراهم آوردن امکان تکثیر آن‌ها در بافت هدف یکی از قابل اعتمادترین مکانیسم‌ها است (Todorov et al. 2012). این تکنیک به عنوان یک روش ساده و ایمن به رهایش کنترل شده پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌ها در بافت هدف کمک موثری می‌نماید (Vidhya et al. 2018) و علاوه بر کمک به افزایش مدت زمان زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در طی تولید تا انبارداری و مصرف محصولات غذایی، از آن‌ها در برابر شرایط نامساعد دستگاه گوارش میزبان نیز محافظت به عمل می‌آورد (بیگدلیان و همکاران، ۱۳۹۰ ;Doherty et al. 2010).

خون حساس‌ترین بافت نسبت به تغییرات فیزیولوژیک در موجودات زنده است، به همین دلیل در بررسی وضعیت سلامت آن‌ها کاربرد وسیعی دارد (Martinez et al. 2002). تجزیه اجزاء خون که تاثیر عواملی چون محیط، تغذیه، استرس و آلاینده‌ها را بر ماهی آشکار می‌سازد، برای بررسی سلامت و شرایط فیزیولوژیک ماهی، ابزاری مهم محسوب می‌شود (Yousefian et al. 2011; Charoo et al. 2014). یافته‌های حاصل از پژوهش‌های خون‌شناسی و ایمنی نسبت به سایر روش‌های تشخیص وضعیت فیزیولوژیک ساده‌تر و کم هزینه‌تر است (محمدنژاد شموشکی، ۱۳۹۲) و می‌تواند به خوبی پاسخگوی بسیاری از ابهامات در زمینه سلامت گله‌های مولد و پرورشی ماهیان باشد (Kazemi et al. 2013). تاکنون مطالعات مختلفی اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر فراسنجه‌های خونی (Li et al. 2012; Gupta et al. 2014; Ullah et al. 2018) را تائید کرده‌اند. با توجّه به درحال توسعه بودن صنعت آبزی‌پروری در کشور جهت تحقق مدیریت بهداشت بهینه به منظور افزایش امنیت غذایی و کاهش هزینه‌های اقتصادی تولید، بررسی پارامترهای ایمنی و خون‌شناسی برای ارزیابی کلی وضعیت سلامت و فیزیولوژیک ماهیان بسیار حائز اهمیّت می‌باشد (قلیچی و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین، پروبیوتیک‌ها در افزایش اشتها و سطح جذب مواد غذایی و به تبع آن تاثیر مثبت بر ترکیب شیمیایی لاشه نیز می‌توانند نقش مهمی ایفا کنند (Gatesoupe et al. 1999; Irianto and Austin, 2002). برای مثال Hooshyar و همکاران (2020) گزارش دادند که با افزودن پروبیوتیک *L.*

rhamnosus ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و نشاسته ذرّت به میزان پروتئین لاشه افزایش یافت و از میزان لیپید لاشه کاسته شد. به همین دلیل به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده بر وضعیت کلی سلامت ماهیان در این پژوهش، فراسنجه‌های خونی و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهیان قزل آلای انگشت قد مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه باکتری

در این تحقیق از باکتری *Lactobacillus rhamnosu* JCM 1136 که به صورت فریز شده در گلیسرول از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه گردید، استفاده شد. نمونه‌های پروبیوتیک پس از تهیه، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در ۴۰ mL محیط کشت TSA و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد فعال گردیدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در ۲۰ mL محیط کشت مایع MRS در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند (توکمه چی و همکاران، ۱۳۹۱).

ریزپوشانی باکتری‌ها

ریزپوشانی باکتری‌ها با آلژینات سدیم در شرایط استریل و به روش امولسیون انجام شد. برای این منظور ابتدا باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت مایع MRS به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصله سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. رسوب به دست آمده در انتهای لوله‌های سانتریفیوژ در محلول PBS به صورت سوسپانسیون در آمد و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند با غلظت $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ باکتری زنده در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند. سپس، یک قسمت از سوسپانسیون باکتریایی با چهار قسمت سدیم آلژینات مخلوط شد. یک قسمت از مخلوط فوق به صورت قطره چکان به ۵ قسمت از روغن نباتی حاوی ۲ درصد توئین ۸۰ اضافه شد و با همزن مغناطیسی به طور یکنواخت مخلوط گردید. بعد از حدود ۱۰ دقیقه یک امولسیون کدر یکنواخت ایجاد گردید و سپس کلرید کلسیم (۰/۱ M) به آرامی و با سرعت (۲۰ ml/s) به آن اضافه گردید تا زمانیکه امولسیون آب و روغن از هم قابل تفکیک شدند. بعد از ۱۰ دقیقه کپسول‌ها تشکیل شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از هم جدا شدند و کپسول‌ها در انتهای لوله‌های فالکون قرار گرفتند. سپس فاز روغن به وسیله یک سرنگ از فاز آبی که حاوی کپسول‌های آلژینات سدیم بود جدا گردید و با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفتند (Sheu et al. 1993). برای تهیه محلول کیتوزان به منظور ریزپوشانی کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم نیز مطابق روش Sarmento و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییرات عمل گردید. به این ترتیب که ابتدا ۰/۴ گرم کیتوزان در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اسیدی شده با ۰/۴ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال حل گردید. سپس، pH محلول حاصل با اضافه کردن NaOH ۱ مولار به حدود ۶ رسید و در اتوکلاو و در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۷ دقیقه استریل شد. در مرحله بعد کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم به محلول کیتوزان انتقال داده شد و به خوبی با هم مخلوط شدند و در انتها دو مرتبه با سرم فیزیولوژی مورد شستشو قرار گرفتند.

شمارش تعداد باکتری‌های ریزپوشانی شده و بررسی میزان زنده‌مانی آن‌ها پس از ریزپوشانی

کپسول‌های خشک شده به مدت دو هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس حدود ۰/۵ گرم از کپسول‌های حاوی پروبیوتیک به ۲ میلی‌گرم محلول سدیم سیترات ۰/۱ مولار اضافه گردید و به منظور آزاد شدن کامل باکتری‌ها در بافر، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به طور یکنواخت تکان داده شد. سپس، رقت سریالی $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۸}$ تهیه شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر رقت در داخل پلیت MRS آگار ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کلنی‌های تشکیل شده در قالب سه تکرار مورد بررسی و شمارش قرار گرفتند (Sohail et al. 2011).

استفاده از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان در جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد

به منظور بررسی اثرات استفاده از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در جیره غذایی ماهیان قزل آلای رنگین کمان انگشت قد، این کپسول‌ها به مدت ۶۰ روز از طریق روش غذادهی در اختیار ماهیان قرار گرفتند. برای این منظور تعداد ۲۲۵ قطعه ماهی قزل آلای رنگین‌کمان انگشت قد با میانگین وزن اولیه (۰/۱۷ ± ۶/۲۳) گرم از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهی در کرج تهیه گردید. تمام بچه ماهیان خریداری شده از یک والد و دارای برگه بهداشتی بودند که به طریق کاملاً استاندارد به کارگاه انتقال داده شدند. ماهی‌ها در قالب پنج تیمار و هر تیمار با سه تکرار به گونه‌ای توزیع شدند که در شروع آزمایش از لحاظ بیومس اختلاف معنی‌داری بین تراف‌ها وجود نداشت. نحوه چیدن تراف‌ها به صورت بلوک‌های تصادفی بود و ماهی‌ها به مدت ۱۴ روز در تراف‌ها نگهداری شده و با غذای تجاری تغذیه شدند (جدول ۱) تا با شرایط تراف‌ها سازگار شوند. منبع آب کارگاه از یک حلقه چاه عمیق تامین می‌گردید و آب به طور دائمی با جریان ۶ لیتر بر دقیقه وارد تراف‌ها می‌شد و آب اضافی از طریق لوله‌های خروجی از کف هر تراف خارج می‌شد (Chen et al. 2020; Kong et al. 2020). تیمار اول (T_1): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمار دوم (T_2): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمار سوم (T_3): ماهیانی که با $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمار چهارم (T_4): ماهیانی که با کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک مورد تغذیه قرار گرفتند و تیمار شاهد (T_5): که با پلت‌های تجاری فاقد کپسول و پروبیوتیک مورد تغذیه قرار گرفتند (Pirarat et al. 2015). در این تحقیق از غذای تجاری GFT_1 ساخت کارخانه صدف (استان لرستان) استفاده گردید. پیش از آغاز دوره غذا دهی مقدار مواد مغذّی موجود در جیره شامل چربی، پروتئین، خاکستر و رطوبت به ترتیب با استفاده از روش سوکسله، روش کجلدال الکتریکی و آون طبق روش استاندارد C محاسبه گردیدند (AOAC, 2000). سپس به ازای هر گرم غذا مقدار $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ باکتری ریزپوشانی شده در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شده و بر روی غذا اسپری گردید و اجازه داده شد غذا به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در یک محل تمیز، خشک گردد. در غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی اسپری گردید. غذا دهی به میزان ۳ درصد وزن توده زنده به طور روزانه در سه نوبت به طور دستی و در ساعت های مشخص (۸، ۱۳ و ۱۸) انجام گرفت. در طول دوره پرورش رژیم نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی برقرار بود و اندازه گیری عوامل کیفی آب همچون دمای آب، اکسیژن محلول و pH به صورت هفتگی انجام گرفت. دمای آب کارگاه ۱ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۵ ± ۷/۴ میلی‌گرم در لیتر، pH ۰/۴ ± ۷/۶ و سختی آب ۲/۷ ± ۲۳۷ میلی گرم در لیتر بود. فضولات و دیگر مواد باقیمانده در کف تراف‌ها هر روز از مخازن سیفون می‌شد (طهماسبی کیهانی و همکاران، ۱۳۸۷ Tuan and Williams, 2007;).

جدول ۱ نتایج تجزیه تقریبی جیره غذایی مورد استفاده برای ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان پرورشی تغذیه شده با لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده (میانگین ± انحراف معیار)

نوع خوراک	پروتئین خام (٪)	چربی خام (٪)	خاکستر خام (٪)	فیبر (٪)	فسفر (٪)	رطوبت (٪)
GFT_1	± ۲/۳	± ۰/۹	± ۱/۱	± ۰/۶	± ۰/۵	± ۱/۲

خون‌گیری

به منظور خونگیری از ماهیان ابتدا از هر تراف سه قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب گردید و با استفاده از اسانس گل میخک با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند (Velisek et al. 2005). بلافاصله بدن آن‌ها خشک گردید و از پهلو بر روی میز آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس، با استفاده از سرنگ ۲ سی سی از ورید ساقه دمی ماهی‌ها نمونه خون گرفته شد و خون گرفته شده از ماهی‌ها به داخل لوله‌های پلاستیکی (ویال) حاوی EDTA (ماده ضدانعقاد) ریخته شد. سپس لوله‌ها به آرامی تکان داده شدند تا خون و

EDTA کاملاً مخلوط شوند. نمونه‌های خون با مراقبت ویژه و در مجاورت کیسه‌های یخ (Icepack) به آزمایشگاه انتقال داده شدند. اندازه‌گیری تمامی فراسنجه‌های خونی از قبیل گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، شمارش افتراقی گلبول-های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل) و نیز هموگلوبین و هماتوکریت با دو تکرار انجام گرفت (جمالزاده و همکاران، ۱۳۸۱).

آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه

در پایان دوره آزمایش ۳ نمونه از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و بعد از خارج کردن امعاء و احشاء و جدا کردن سر و باله و فیله نمودن کامل ماهیان، به وسیله چرخ گوشت چرخ شدند و مخلوط حاصله جهت آنالیز لاشه در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گشت. برای آنالیز تقریبی ترکیب لاشه ماهیان جهت کنترل مقادیر پروتئین کل، با استفاده از دستگاه کجلدال، چربی با استفاده از روش سوکسله، خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹ ساعت و رطوبت با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت اندازه گیری گردید (AOAC, 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. کلیه داده‌های جمع آوری شده در هر مرحله در نرم‌افزار اکسل ثبت و مورد بررسی اولیه قرار گرفتند. سپس، داده‌ها به نرم‌افزار spss 22 منتقل گردیدند. در گام نخست نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolomogrov-Smirnov مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One-way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ($p<0/05$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید.

نتایج

در آغاز پژوهش تعداد باکتری‌های *L. rhamnosus* زنده قبل از ریز پوشانی $1/8 \times 10^8$ CFU/mL محاسبه شد. بر اساس نتایج بدست آمده از شمارش باکتری‌های ریزپوشانی، تعداد باکتری‌های زنده به دام افتاده شده در کپسول‌های آلژینات سدیم $0/07 \pm 1/65 \times 10^8$ CFU/mL محاسبه شد به این معنی که بازده ریزپوشانی ۹۱ درصد بود و تعداد باکتری‌های زنده به دام افتاده شده در کپسول‌های آلژینات سدیم-کیتوزان $0/09 \pm 1/58 \times 10^8$ CFU/mL محاسبه شد به این معنی که بازده ریزپوشانی ۸۷ درصد بود ($p>0/05$). در پایان دوره پرورش ماهیان مربوط به تیمارهای مختلف با میانگین وزن ($33/13 \pm 1/19$) گرم از لحاظ برخی از فاکتورهای خونی با یکدیگر اختلاف معنی داری ($p<0/05$) را نشان دادند (جدول ۲). بیشترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان تیمار (T_2) که در جیره غذایی آن‌ها از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم کیتوزان استفاده شده بود مشاهده گردید که با ماهیان تیمار شاهد (T_5) اختلاف معنی داری داشتند ($p<0/05$). میزان مونوسیت و نوتروفیل نیز در ماهیان تیمار (T_2) از تیمار شاهد (T_5) بیشتر بود اما در مورد این دو فاکتور اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$). بیشترین مقدار حجم متوسّط گلبول قرمز (MCV) در تیمار (T_4) اندازه گیری گردید که با تیمارهای حاوی پروبیوتیک دارای اختلاف معنی دار بود ($p<0/05$) اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). بیشترین مقادیر متوسّط هموگلوبین گویچه (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) هم در ماهیان تیمار (T_1) محاسبه گردید که با ماهیان تیمار شاهد (T_5) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/05$). از لحاظ تعداد بازوفیل و ائوزینوفیل بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>0/05$). تعداد لنفوسیت‌ها در ماهیان تیمار (T_4) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود اما به غیر از تیمار (T_2) با سایر تیمارها فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p>0/05$). همچنین، بررسی ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان در پایان دوره آزمایش نشان دهنده افزایش مقدار پروتئین و کاهش مقدار چربی و خاکستر در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده (T_1) و (T_2) در مقایسه با تیمار شاهد (T_5) بود (جدول-۳). به طوری که بیشترین میزان پروتئین در لاشه ماهیان تیمار پروبیوتیکی

ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان (T_2) و کمترین میزان آن در لاشه ماهیان تیمار شاهد (T_5) محاسبه گردید ($p<۰/۰۵$). همچنین بیشترین میزان چربی و خاکستر در لاشه ماهیان تیمار شاهد (T_5) و کمترین مقادیر این دو پارامتر در لاشه ماهیان تیمار (T_2) محاسبه شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲ نتایج مربوط به بررسی فاکتورهای خونی در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده در پایان دوره آزمایش (میانگین ± انحراف معیار).

فراسنجه‌های خونی	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
گلبول قرمز ($۱۰^۶$/mL)	۸/۴۸ ± ۰/۲۹^{a}	۸/۶۷ ± ۰/۳۳^{a}	۷/۷۵ ± ۰/۶۲^{b}	۷/۲ ± ۰/۴۴^{c}	۶/۸۶ ± ۰/۲۶^{c}
گلبول سفید ($۱۰^۳$/mL)	۶/۹ ± ۰/۲۵^{b}	۷/۱۸ ± ۰/۳۸^{a}	۵/۷۳ ± ۰/۲۸^{c}	۴/۹ ± ۰/۲۵^{d}	۴/۶ ± ۰/۱۲^{e}
هموگلوبین (g/dL)	۸/۴۸ ± ۰/۲۹^{a}	۸/۶۷ ± ۰/۳۳^{a}	۷/۷۵ ± ۰/۶۲^{b}	۳۸/۵ ± ۱/۲۵^{d}	۳۷/۷ ± ۱/۳۴^{d}
هماتوکریت (٪)	۴۱/۹ ± ۱/۶۴^{b}	۴۴/۳۶ ± ۱/۳۲^{a}	۴۰/۱۲ ± ۱/۴۶^{c}	۳۸/۵ ± ۱/۲۵^{d}	۳۷/۷ ± ۱/۳۴^{d}
MCV (fl)	۳۳۲/۵ ± ۹/۱۲^{b}	۳۳۱/۰۴ ± ۹/۵^{b}	۳۳۱/۶ ± ۷/۲۵^{b}	۳۴۴/۲ ± ۶/۹^{a}	۳۳۷/۲ ± ۵/۶^{ab}
MCH (pg)	۶۷/۳ ± ۲/۱۶^{a}	۶۴/۷ ± ۲/۷۲^{b}	۶۴/۰۴ ± ۲/۳۶^{b}	۶۴/۳ ± ۱/۹۵^{b}	۶۱/۲۵ ± ۱/۸۴^{c}
MCHC (g/dL)	۲/۲۳ ± ۱/۱۸^{a}	۱۹/۵ ± ۱/۰۴^{ab}	۱۹/۳ ± ۰/۸۸^{bc}	۱۸/۷ ± ۰/۸^{cd}	۱۸/۱۶ ± ۰/۵۳^{d}
نوتروفیل (٪)	۳۰/۳ ± ۱/۲^{ab}	۳۱ ± ۱/۳^{a}	۳۰ ± ۰/۵^{b}	۳۱ ± ۱^{a}	۳۰/۴ ± ۱^{ab}
بازوفیل (٪)	۲/۹ ± ۱/۱۵	۲/۹ ± ۱	۲/۹ ± ۱/۲۵	۲/۹ ± ۱/۲	۲/۹ ± ۱
ائوزینوفیل (٪)	۱/۶۶ ± ۰/۵^{a}	۱/۶۶ ± ۰/۲	۱/۶۶ ± ۰/۱۵	۱/۵ ± ۰/۱۵	۱/۵ ± ۰/۱
مونوسیت (٪)	۳ ± ۰/۵^{a}	۳/۱ ± ۰/۵	۳ ± ۰/۴	۳/۱ ± ۰/۴	۳ ± ۰/۴
لنفوسیت (٪)	۶۱/۸ ± ۲/۴^{ab}	۶۰/۷ ± ۱/۳۳^{b}	۶۲ ± ۲^{ab}	۶۲/۸ ± ۱/۴۵^{a}	۶۲/۱ ± ۱/۳۳^{ab}

حروف لاتین غیرهمنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر ردیف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳ نتایج مربوط به بررسی ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده در پایان دوره آزمایش (میانگین ± انحراف معیار).

ترکیب لاشه (٪)	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
رطوبت	۷۰/۳۶ ± ۰/۶۱ ^{a}	۷۰/۱۴ ± ۰/۴۷ ^{a}	۷۰/۶۵ ± ۰/۸۷ ^{a}	۶۹/۴۴±۰/۳۹ ^{b}	۷۰/۱۹ ± ۰/۷۴ ^{a}
پروتئین	۱۷/۸ ± ۰/۵۷ ^{ab}	۱۷/۹۶ ± ۰/۶۳ ^{a}	۱۷/۳ ± ۰/۹۲ ^{bc}	۱۶/۸۵ ± ۰/۷۵ ^{cd}	۱۶/۳۲ ± ۰/۳۵ ^{d}
چربی	۷/۶۸ ± ۰/۲۲ ^{b}	۷/۴۴ ± ۰/۲۸ ^{b}	۷/۵۶ ± ۰/۴۹ ^{b}	۸/۲۲ ± ۰/۳۴ ^{a}	۸/۱۹ ± ۰/۶۶ ^{a}
خاکستر	۳/۲۷ ± ۰/۳۹ ^{c}	۳/۱۷ ± ۰/۴۵ ^{c}	۳/۶۶ ± ۰/۳۲ ^{b}	۳/۶۴ ± ۰/۳۸ ^{b}	۴/۰۸ ± ۰/۲۶ ^{a}

حروف لاتین غیرهمنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر ردیف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری و بحث

تغذیه نقش مهمی در میزان رشد و عملکرد سیستم ایمنی ماهی‌ها و مقاومت آن‌ها در برابر بیماری دارد (Webster and Lim, 2002). در این راستا استفاده از مکمل‌های غذایی مختلف مانند پروبیوتیک‌ها در جهت کاهش آلودگی-های زیست محیطی، افزایش قابلیت هضم خوراک، بهبود استفاده از مواد مغذی و افزایش رشد و تولید ماهی اهمیّت زیادی دارد (جلالی، ۱۳۸۸). در مطالعه حاضر به منظور افزایش قابلیت زنده‌مانی باکتری *L. rhamnosus* در شرایط دستگاه گوارش ماهی قزل آلای رنگین کمان، این باکتری‌ها به وسیله آلژینات سدیم و کیتوزان مورد ریزپوشانی قرار گرفتند. بازده ریزپوشانی مناسب در کپسول‌های ساخته شده

در این مطالعه نشان از تناسب مواد و تکنیک‌های مورد استفاده برای ریزپوشانی با نوع پروبیوتیک و نیز وجود دقت مناسب در انجام مراحل مختلف فرآیند ریزپوشانی می‌باشد. در آبزی پروری، شاخص فراسنجه‌های خونی به عنوان یک ابزار مهم برای تعیین تغییرات فیزیولوژیکی و وضعیت سلامت آبزیان در نظر گرفته می‌شود (Ullah et al. 2018) و تاکنون مطالعات مختلفی به بررسی اثرات پروبیوتیک‌ها بر روی شاخص‌های ایمنی و هماتولوژیکی آبزیان پرداخته‌اند. برای مثال Hassaan و همکاران (2014) افزایش معنادار تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی مریگال *Cirrhinus mrigala* را در پاسخ به افزودن پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Saccaromyces cerevisiae*به جیره غذایی گزارش دادند و Gora و همکاران (2018) اثرات مثبت *S. cerevisiae* بر روی شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی *C. carpio* را تائید کردند.

همانگونه که گفته شد در مطالعه حاضر بیشترین مقادیر گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، هماتوکریت، هموگلوبین و منوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان (T_2) محاسبه گردید. تقریباً تمام اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می‌گردد به هموگلوبین موجود در گلبول قرمز خون متصل می‌باشد (Nelson and Cox, 2000). از این رو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه گیری غلظت هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول‌های قرمز دارای رابطه-ای منطقی می‌باشد که پیش از این نتایج مشابهی نیز توسط (Newaj-Fyzul et al. 2007; Daniel, 2010) در این خصوص به دست آمده است. افزایش درصد هماتوکریت در تیمارهای (T_1) و (T_2) نیز مشابه مطالعه (Al-Dohail et al. 2009) بر روی گربه ماهی آفریقایی (*Claris gariepinus*) می‌باشد چراکه هماتوکریت نیز تابعی از گلبول‌های قرمز است و رابطه مستقیم با آن دارد (Tangestani et al. 2011). کاهش حجم متوسّط گلبول‌های قرمز (MCV) در مطالعه حاضر نشان دهنده عدم وجود التهاب است که سبب حرکت و تعلیق گلبول‌های قرمز شده و سرعت رسوب آن‌ها و تشکیل لخته‌های درون رگی را کاهش می‌دهد که یک ویژگی مثبت در فیزیولوژی دستگاه گردش خون محسوب می‌شود (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹) و با نتایج مطالعه Jha و همکاران (2015) مطابقت دارد. وجود اختلاف معنی دار در متوسّط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و میزان هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ریز پوشانی شده نسبت به تیمار شاهد نیز با نتایج حاصل از مطالعات (Newaj-Fyzul et al. 2007; Daniel, 2010) مطابقت داشت. افزایش میزان هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در پایان دوره در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ریز پوشانی شده نسبت به تیمار شاهد نشان دهنده اثر مثبت پروبیوتیک بر میزان هموگلوبین و قابلیت انتقال گازهای تنفسی توسط هموگلوبین است (Tangestani et al. 2011). افزایش میزان نوتروفیل خون می‌تواند به دلیل حضور ماهی در معرض استرس یا عوامل بیماری‌زا باشد (Tort et al. 2003). اختلاف اندک در میزان نوتروفیل خون تیمارهای آزمایشی مختلف در مطالعه حاضر را می‌توان به عنوان نشانه‌ای مبنی بر سالم بودن جیره‌های غذایی و شرایط پرورشی ماهیان قلمداد نمود. عدم وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد منوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد با نتایج (شناور ماسوله، ۱۳۹۱) همخوانی دارد. تعداد لنفوسیت‌ها در تیمار-های تغذیه شده با پروبیوتیک ریزپوشانی شده در مقایسه با تیمار شاهد اندکی کاهش پیدا کرده بود که ممکن است به این خاطر باشد که با افزایش میزان عوامل فاگوسیت کننده نیاز به لنفوسیت کمتر شده باشد که این مورد نیز با نتایج حاصل از مطالعه (شناور ماسوله، ۱۳۹۱) همخوانی دارد، هر چند که این میزان کاهش معنی‌دار نبود. تاثیر پروبیوتیک‌ها در افزایش تعداد گلبول‌های سفید نیز پیش از این به اثبات رسیده است (Irianto and Austin, 2002; Balcazar et al. 2006; Newaj-Fyzu et al. 2007). لایزوزایم و ایمنوگلوبولین در ماهیان از کلیدی‌ترین مولفه‌های تعیین وضعیت سیستم ایمنی محسوب می‌شوند که توسط گلبول-های سفید تولید می‌شوند (Ibrahem, 2015). بنابراین افزایش میزان گلبول‌های سفید در پاسخ به استفاده از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در جیره‌های غذایی می تواند تقویت تحریک سیستم دفاعی بدن ماهی، تولید آنتی بادی

علیه عوامل مهاجم خارجی و تحریک فاگوسیتوز را به همراه داشته باشد.

نتایج حاصل از بررسی ترکیب لاشه در تحقیق حاضر نشان داد که در تیمارهایی که از جیره‌های حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده تغذیه کرده بودند، میزان پروتئین بیشتر بود و از میزان چربی و خاکستر کاسته شده بود که این امر در آبزی پروری بسیار مطلوب تلقی می‌گردد (Amir et al. 2019) و با نتایج حاصل از مطالعه El-Haroun و همکاران (2006) در مورد اثر پروبیوتیک‌ها بر لاشه ماهی قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. Azari و همکاران (2011) بیان نمودند که استفاده از نوعی پروبیوتیک تجاری با نام GroBiotic-A سبب افزایش معنی دار میزان لیپید و پروتئین لاشه ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید. Opiyoa و همکاران (2019) در مطالعه بر روی ماهیان تیلاپیا *O. niloticus* تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک‌های *S. cerevisiae* و *B. subtilis* شاهد افزایش میزان پروتئین لاشه و کاهش میزان چربی و خاکستر آن بودند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مقابل Gonzalez و همکاران (2018) در آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان (*Totoaba macdonaldi*) تغذیه شده با گروهی از باسیلوس‌های غیر بیماری‌زا و دارای خاصیت پروبیوتیکی و Yazici و همکاران (2015) در آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان قزل آلای رنگین کمان با پروبیوتیک‌های *Lactobacillus plantarum* و *B. subtilis* هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نکردند.

تفاوت در میان نتایج مطالعات فوق می‌تواند به خاطر تفاوت در اندازه ماهی‌ها، مقادیر پروبیوتیک افزوده شده به جیره غذایی آن‌ها، تناسب پروبیوتیک با میزبان و میزان پروبیوتیک زنده رسیده شده به روده میزبان باشد (Opiyoa et al. 2019). علاوه بر آن یک پروبیوتیک ممکن است به خاطر شرایط فیزیولوژیکی میزبان یا فیزیکوشیمیایی آب، در تمام محیط‌های پرورشی کارآمد نباشد (Amir et al. 2019). افزایش میزان پروتئین در لاشه ماهیان مطالعه حاضر می‌تواند به خاطر افزایش جذب مواد غذایی باشد چرا که افزایش حضور پروبیوتیک‌ها در روده و بهبود فلور میکروبی آن خود منجر به افزایش جذب آمینو اسیدها می‌شود (Nayak, 2010; Newsome et al. 2011; Welker and Lim, 2011).

نتایج این مطالعه به خوبی نشان داد که استفاده از تکنیک ریزپوشانی برای پروبیوتیک *L. rhamnosus* با کمک به افزایش پایداری و زنده مانی پروبیوتیک در دستگاه گوارش موجب تقویت فراسنجه‌های خونی و بهبود ترکیب شیمیایی لاشه در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان گردید و این اثرات بیشتر در تیمار آلژینات سدیم-کیتوزان (T_2) مشهود بود. بنابراین استفاده از تکنیک ریزپوشانی به منظور محافظت از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط نامساعد دستگاه گوارش را توصیه می‌نماید و این امید می‌رود که استفاده از این کپسول-های پروبیوتیکی در مزارع پرورش ماهی قزل آلای کشور نقش مثبتی در کاهش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و سایر مواد شیمیایی ضد عفونی کننده را به همراه داشته باشد.

منابع

بیگدلیان، ا.، شاکریان، ا.، علی اکبرنیا، ع.، مهدوی، ا.، علیپور، م.، حاجیان، س. ۱۳۹۰. بررسی مزیت‌ها و محدودیت‌های روش‌های مختلف انکپسولاسیون باکتری‌های پروبیوتیک در طی تولید و نگهداری مواد غذایی. اولین سمینار ملی امنیت غذایی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد سواد کوه، ۹ ص.

توکمه چی، ا.، شمسی، ح.، مشکینی، س.، دلشاد، ر.، قاسمی مغانجوقی، ا. ۱۳۹۱. بهبود شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده توام از ویتامین C و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus*. مجله علمی شیلات ایران ۲۱: ۲۲-۱۳.

جلالی. س.م.ح. ۱۳۸۸. اثرات تغذیه کارنیتین و راکتوپامین بر ماهی قزل آلای رنگین کمان. رساله دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۰۰ ص.

جمالزاده، ح.،کیوان، ا.، جمیلی، ش.، عریان، ش.، سعیدی، ع.ا. ۱۳۸۱. بررسی برخی فاکتورهای خونی آزادماهی دریای خزر. مجله علمی شیلات ۱: ۲۶-۲۵.

ذریه‌زهرا، س.ج.، عادل، م. ۱۳۹۵. بیماری‌های ویروسی نوپدید و بازپدید، چالشی اساسی پیش روی صنعت آبزی‌پروری. نوزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، ۵ ص.

طهماسبی کیهانی، ا.، کیوان‌شکوه، س.، نعمت‌اللهی، ا.، محمودی، ن.، زانوسی، ح.پ. ۱۳۸۷. بررسی عملکرد نوکلئوتید موجود در جیره بر شاخص‌های رشد و مورفولوژی روده در ماهی قزل آلای رنگین کمان انگشت قد (*O. mykiss*). مجله علوم و فنون دریایی ۹: ۵۴-۴۵.

شناور ماسوله، ع. ۱۳۹۱. شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک روده بچه تاسماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) و کارایی آن‌ها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمونوفیزیولوژی. رساله دکتری، دانشکده دامپزشکی، گروه بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران. ۱۴۰ ص.

قلیچی، ا.، یوسفیان، م.، کشوری، ف.، جرجانی، س. ۱۳۹۲. تأثیر تیمارهای مختلف حرارتی روی برخی پارامترهای ایمنی (C3، IgM و C4) و بیوشیمیایی (آلبومین و پروتئین تام) سرم خون قزل آلای رنگین کمان (*O. mykiss*). مجله توسعه آبزی پروری ۷: ۵۷-۴۷.

کاظمی، ر. ا.، پوردهقانی، م.، یوسفی، الف.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ ص.

محمدنژاد شموشکی، م. ۱۳۹۲. تعیین و بررسی مقایسه‌ای برخی از فاکتورهای خونی و آنزیمی سرم خون ماهیان کپور، فیتوفاگ و آمور. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنان ۶: ۴۰-۳۵.

AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International, 19th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. USA.

Al-Dohail, M.A., Hashim, R, Aliyu-paiko, M. 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance, hematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Claris gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquaculture Research 40: 1642-1652.

Amir, I., Zuberi, A., Kamran, M., Imran, M., Murtaza, M.U.H. 2019. Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. Fish and Shellfish Immunology 95: 464-472.

Azari, A. H., Hashim, R., Azari-Takami, G., Farabi, S.M.V., Darvish, M., Safari, R. 2011. Effect of (GroBiotic-A) on the growth performance and intestinal microflora on rainbow trout (*O. mykiss* Walbaum). Journal of Research in Biology 1: 325-334.

Balcazar, J. L., Decamp, O., Vendrell, D., Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I. 2006. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. Microbial Ecology in Health and Disease 18: 65-70.

Charoo, S.Q., Chalkoo, S.R., Qureshi, T.A., 2014. Rainbow trout (*O. mykiss*) blood profile alterations. E-Journal of Science and Technology 2: 29-35.

Chen, Y., Zhu, X., Yang, Y., Han, D., Jin, J., Xie, S. 2014. Effect of dietary chitosan on growth performance, hematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquaculture Nutrition 20: 532-546.

Daniel, C., Marta, V.S., Claudia, M.F., Fernanda, Me. F., Maria, J.T.R., Antenor, A.S. 2010. Hematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lihobaes catesbeianus* Fed Probiotics. Aquaculture Research 41: 1064-1071.

Doherty, G.A., Moss, A.C., Cheifetz, A.S. 2010. Capsule Endoscopy in Suspected Crohn's Disease: "Yield" Does Not Equal "Diagnosis". American Journal of Gastroenterology 105: 2111-2112.

El-Haroun, E.R., Goda, A.M.A.S., Chowdury, M.A.K. 2006. Effect of dietary probiotic biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile Tilapia. Aquaculture Research. 37: 1473-1480.

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

Gonzalez, F.M.L., Gatlin, D.M., Urquidez, B.P., Ree Rodríguez, C, D.L., Duarte, R, L., Sanchez, F., Casas, R. A., Yamamoto, F.Y., Ochoa, L.A., Perez, V.M. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture 491: 239-251.

Gora, A.H., Sahu, N.P., Sahoo, S., Rehman, S., Dar, S.A, Ahmad, I. 2018. Effect of dietary *Sargassum wightii* and its fucoidan-rich extract on growth, immunity, disease resistance and antimicrobial peptide gene expression in *Labeo rohita*. International Journal of Aquaculture Research 10: 115-131.

Gupta, A., Gupta, P., Dhawan, A. 2014. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. Fish and Shellfish Immunology 41: 113-119.

Hassaan, M., Soltan, M., Ghonemy, M. 2014. Effect of symbiotic between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Aquaculture Research 40: 199-208.

Hooshyar, Y., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., Gandomi, H. 2020. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on different parameters related to health status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the protection against *Yersinia ruckeri*. Probiotics and Antimicrobial Proteins 12: 1370-1384.

Ibrahem, M.D. 2015. Evolution of probiotics in aquatic world: potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. Journal of Advanced Researches 6: 765-791.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout (*O. mykiss*). Fish Disease 25: 333-342.

Jha, D.K., Bhujel, R.C, Anal, A.K. 2015. Dietary supplementation of probiotics improves survival and growth of Rohu (*Labeo rohita*). hatchlings and fingerlings in outdoor tanks. Aquaculture 435: 475-479.

Kailasapathy, K. 2008. Formulation, administration and delivery of probiotics Therapeutic Microbiology. American Society of Microbiology 27: 97-118.

Kazemi, R., Pourdehghani, M., Dezhandian, S., Hallajian, A., Yousefi Jourdehi, A., Yarmohammadi, M., Yazdani, M.A., Mohseni, M., Mohammadi Pareshkoh H., Yeganeh, H. 2013. Study on the propagation possibility in reared Great Sturgeon, *Huso huso* by GnRH synthetic hormone for production of fingerling. Tehran, Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute. p. 109.

Kong, Y., Gao, C., Du, X., Zhao, J., Li, M., Shan, X., Wang, G. 2020. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*). Fish and Shellfish Immunology 102: 412-421.

Li, W., Deng, B., Cui, L., Chen, N., Zhou, W., Yu, D. 2012. Several indicators of immunity and antioxidant activities improved in grass carp given a diet containing Bacillus additive. Journal of Animal and Veterinary Advances 11: 2392-2397.

Martinez-Alvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., GarciaGallego, M., Sanz., A. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. Journal Experimental Biology 205: 3699-3706.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and Shellfish Immunology 29: 2-14.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. Leninger Principles of Biochemistry. 3rd. ed. ISBN-10: 1464126119.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A. Brunt, J, Austin, B. 2007. *Bacillus Sabtilis* AB1 controls *Aermonas* infection in Rainbow trout (*O. mykiss*). Applied Microbiology 103: 1699-1706.

Newsome, S.D., Fogel, M.L., Kelly, L., del Rio, C.M. 2011. Contributions of direct incorporation from diet and microbial amino acids to protein synthesis in Nile tilapia. Functional Ecology 25: 1051-1062.

Nikoskelainen, S., Arthur, C., Goran, B., Seppo, S., Essa, M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology 15: 443-452.

Opiyoa, M.A., Jumbe, J., C.Ngugi, C., Charo-Karisad, H. 2019. Different levels of probiotics affect growth, survival and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. Scientific African. 4: 1-8.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Physiology and Biochemistry 36: 969-977.

Peredo, A.M., Buentello, A., Gatlin, D.M.I., Hume, M. 2015. Evaluation of a dairy yeast prebiotic in the diet of juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of World Aquaculture Society 46: 92-101.

Pinpimai, K. Channarong, R. Nantarika, C. Takayuki, K. Masashi, M., Nopadon, P. 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccaromyces cerevisiae* JCM7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Research in Veterinary Science 102: 103-111.

Pirarat, N., Komkiew, P., Channarong, R., Nantarika, Ch., Ei Lin, O., Takayuki, K and Masashi, M. 2015. Vaiability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against Streptococcus agalactiae. Animal Feed Science and Technology 207: 93-103.

Ramos, M.A., Weber, B., Goncalves, J.F., Santos, G.A., Rema, P., Ozorio, R.O.A. 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbial and improved growth of juvenile rainbow trout (*O. mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, p. 1-6.

Sarmento, B., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Ferreira, D.C., Neufeld, R.J. 2007. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 7: 2833-2841.

Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Heymann, H. 1993. Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment. Journal of Dairy Science 76: 1902-1907.

Sohail. A., Turner, M.S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B. 2011.

Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. International Journal of Food Microbiology 145: 162-168.

Tangestani, M.H., Jaffari, L., Vincent, R.K., Maruthi Sridhar, B.B. 2011. Spectral characterization and ASTER-based lithological mapping of an ophiolite, SW Iran. Remote Sensing of Environment 115: 2243-2254.

Todorov, S.D., Leblanc, J.G., Franco, B.D.G.M. 2012. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 973-984.

Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Inmunología 22: 277-286.

Tuan L.A., Williams, K.C. 2007. Optimum dietary protein and lipid specification for juvenile Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). Aquaculture 267: 129-138.

Ullah, A., Zuberi, A., Ahmad, M., Bashir, S. A., Younus, N., Ullah, S. 2018. Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (*Cirrhinus mrigala*) in a natural earthen polyculture system. Fish and Shellfish Immunology 72: 266-272.

Velisek, J. Svobodova, Z., Piaakova, V. 2005. Effects of clove oil anesthesia on rainbow trout (*O. mykiss*). Acta Veterinaria Brunensis 74: 139-146.

Vidhya, S.H., Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J. 2018. Effect of microencapsulated probiotic *Bacillus vireti* 01-polysaccharide extract of *Gracilaria folifera* with alginate-chitosan on immunity, antioxidant activity and disease resistance of *Macrobrachium rosenbergii* against *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology 73: 112-120.

Welker, T.L., Lim, C. 2011. Use of probiotics in diets of tilapia. Journal of Aquapuncture. Research and Development 1: 1-8.

Webster, C.D., Lim, C.E. 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, CABI Publishing. Wallingford, Oxon. p. 418.

Yazici, I., Olcay, H., Sevdan, Y., Murat, Y. 2015. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*O. mykiss*) under sublethal water temperature. Marine Science and Technology Bulletin 4: 21-28.

Yousefian, M., Sheikholeslami, A.M., Dawood, K. 2011. Serum biochemical parameter of Male, Immature and female Persian Sturgeon (*Acipencer persicus*). Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5: 476-481.

Zilberg, D., Tal, A., Froyman, N., Abutbul, S., Dudai, N., Golan-Goldhirsh A. 2010. Dried leaves of *Rosmarinus officinalis* as a treatment for *Streptococcosis* in tilapia. Journal of Fish Diseases 33: 361.