اثرات سینرژیستی اسید آلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) بر شاخص‌های رشد، خونی، ترکیب لاشه و فلور میکروبی روده در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی جافرنوده[1*]، امیر توکمه چی[2]، ابراهیم حسین نجدگرامی[2]، عبدالمجید حاجی مرادلو[3]، فرزانه نوری[2]

۱- دانش آموخته دوره دکترای تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۴ اسفند ۱۳۹۵

چکیده

به منظور بررسی اثرات سینرژیستی اسیدآلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن اولیه ۰/۰۵±۲/۷۵ گرم، آزمایشی به مدت ۸ هفته با به‌کارگیری شش تیمار، شامل: تیمار شاهد، جیره حاوی 10^7CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات (تیمار۲)، جیره حاوی ۱ درصد پتاسیم سوربات (تیمار۳)، جیره حاوی ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۴) و جیره حاوی ترکیب ۱ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۵) صورت پذیرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و کارائی پروتئین در تیمار ۴ مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). از نظر ترکیب لاشه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان گلبول سفید درتیمار ۴ به طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود ($P<0/05$)، ولی اختلاف معنی‌داری در میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، MCV، MCH وMCHC مشاهده نشد ($P>0/05$). بررسی تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد به‌طوری که بیش‌ترین میزان آن در تیمار ۴ مشاهده شد ($P<0/05$). در مجموع با توجه به نتایج و اثرات مثبت، افزودن ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g باکتری *L. casei* به جیره غذایی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، پتاسیم سوربات، *Lactobacillus casei*.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). a.jafar55@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر با توجه به روند روز افزون جمعیت جهان یکی از معضلات اساسی جوامع بشری فراهم نمودن غذا و منابع پروتئینی برای جمعیت رو به رشد کره زمین است (FAO, 2002). آبزی‌پروری به عنوان یک راه‌کار اساسی، می‌تواند از طریق تأمین پروتئین مورد نیاز انسان، نقش مهمی را در این زمینه ایفا کند. هدف نهایی در انواع مختلف فعالیت‌های آبزی‌پروری، افزایش بازده تولید، جهت به حداکثر رساندن سوددهی می‌باشد. یکی از روش‌های افزایش تولید در آبزی پروری، کنترل بیماری بوده که در این زمینه، می‌توان به استفاده از داروهای ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) اشاره کرد، متاسفانه مصرف طولانی مدت این ترکیبات سبب ایجاد مشکلاتی عمده‌ایی از جمله، مقاوم شدن عوامل‌بیماری‌زا، تغییر فلور میکروبی روده (که در سلامت میزبان نقش بالقوه‌ایی دارند) به سمت یک فلور نامتعادل، کاهش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، انتقال این مواد در نهایت به انسان، آلودگی‌های زیست محیطی و افزایش هزینه‌های جاری تولید ماهی می‌گردد (Gatlin *et al*., 2006). از جمله ترکیباتی که به عنوان جایگزین مواد ضد میکروبی مطرح می‌باشد می‌توان به اسیدهای آلی اشاره کرد (Luckstadt, 2008).

طبق تعریف سازمان خوار و بار جهانی[1] و سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب مورد استفاده قرار گیرند می‌توانند سبب بهبود وضعیت سلامت میزان شوند (Ghosh *et al*., 2008). ازجمله مزایای استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود جذب کلسیم، سنتز ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و بهبود تعادل میکروفلور روده (Rasdhari *et al*., 2008)، تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول سرم خون، افزایش کارائی غذایی (که این امر از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب و نیز تولید آنزیم‌های گوارشی) اشاره کرد (Khan and Ansari, 2007). با این حال زنده‌مانی پایین باکتری‌های پروبیوتیکی در دستگاه گوارش و توانایی تحمل شرایط حاکم بر آن از مشکلات کاربرد این میکروارگانیسم‌ها در صنعت آبزی پروری است (Mahious *et al*., 2005).

اسیدهای‌آلی ترکیباتی هستند که دارای گروه کربوکسیلیک در ساختمان خود هستند. از بین این ترکیبات آنهایی که بین ۱ تا ۷ کربن دارند دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند (Eidelsburger, 1998). همه‌ی اسیدهای آلی به‌طور طبیعی در بافت سبزیجات مختلف و حیوانات وجود دارند، بنابراین به‌طور طبیعی می‌توانند در مواد غذایی به‌عنوان یک فرآیند طبیعی متابولیسمی بیوشیمیایی ظاهر شده و یا مستقیماً به‌عنوان اسیدی‌کننده، هیدرولیزکننده رشد باکتری‌ها به تولیدات غذایی اضافه گردند. امروزه، توجه ویژه‌ای به کاربرد تجاری اسیدهای‌آلی در جیره ماهیان و سایر جانداران در جهت کنترل بیماری‌ها و افزایش کارایی رشد صورت می‌گیرد. محققین گزارش کرده‌اند که چندین اسیدآلی، نمک‌ها و ترکیبات متعلق آنها می‌توانند موجب افزایش رشد، مصرف غذا و مقاومت در برابر بیماری در ماهیان گردند (Wing-Keong *et al*., 2009).

با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک‌ها واسیدهای آلی در صنعت آبزی‌پروری از جمله: (Rahmati Andani, Suzer, *et al*., ;Ghosh *et al*., 2008 ؛*et al*., 2011

[1] Food and Agriculture Organization

Wing-Keong, *et al*., ;Ramli, *et al*., 2005 ;2008 Bairagi, *et al*., ;Vielma,, *et al*., 1999 ;2009 Romano, *et al*., 2015 ; Castillo, *et al*., ; 2004 2014) این تحقیق با هدف بررسی اثرات سینرژیستی اسیدآلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei* در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انجام شد.

مواد و روش

اسیدهای‌آلی مورد استفاده

اسیدآلی مورد استفاده در این تحقیق پتاسیم سوربات با فرمول شیمیایی (CH3CH=CHCH= CHCOOK) و درجه خلوص ۹۹ درصد ساخت شرکت سیگما (آمریکا) بود.

سویه باکتری مورد استفاده

پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*)، یک سویه بومی، از خانواده *لاکتوباسیلوس‌ها* (گرم مثبت)، که از روده ماهی کپور معمولی جدا سازی شده (پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه) (Rahmati Andani, *et al*., 2011) و به‌صورت لیوفیلیزه در اختیار ما قرار گرفته شد.

آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی

به منظور احیاء پروبیوتیک *L. casei* از حالت لیوفیلیزه، از محیط کشت MRS broth استفاده و پس از تلقیح باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه آون (مدل FD115 ، ساخت کمپانی BINDER آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رشد باکتری، برای حذف محیط کشت در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل 5810R ساخت کمپانی eppendorf آلمان) با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و رسوب حاصله را سه بار با سرم فیزیولوژی استریل، شستشو و در مرحله آخر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^7 CFU/g تهیه و جهت اسپری به غذا آماده گردید (Rahmati Andani, *et al*., 2011).

تیمارهای مورد استفاده در آزمایش

برای انجام این پژوهش تعداد ۳۶۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن اولیه ۰/۰۵±۲/۷۵ گرم استفاده شدند. که در ۶ تیمار جیره‌ای شامل: جیره تجاری (تیمار شاهد)، جیره حاوی 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات (تیمار۲)، جیره حاوی ۱ درصد پتاسیم سوربات (تیمار۳)، جیره حاوی ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۴) و جیره حاوی ترکیب ۱ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار۵) و هر تیمار با سه تکرار صورت پذیرفت. بیومتری ماهیان هر دو هفته یک بار انجام شد.

جیره غذایی و تغذیه ماهیان

برای انجام آزمایش از غذای تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (غذای بهدانه شمال، شهرک صنعتی میرود بابلسر) استفاده شد و برای تیمارهای آزمایشی، باکتری و اسیدآلی، پس از آماده سازی بصورت اسپری به غذا اضافه و برای کاهش میزان آبشویی از ژلاتین ۴ درصد استفاده گردید. بچه‌ماهیان به مدت دو ماه و روزانه ۳ بار غذادهی شدند (ساعت ۸

صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر) و میزان غذادهی حدود ۳ درصد وزن بود.

بررسی میزان رشد

برای بررسی رشد ماهیان و مقایسه بین تیمارها از شاخص‌های رشد شامل میزان افزایش، میزان کارآئی پروتئین (Ai, *et al*., 2007)، نرخ رشد ویژه (Hevroy, *et al*., 2005) و ضریب تبدیل غذایی (Helland, *et al*., 1996) استفاده شد.

بررسی ترکیبات لاشه

جهت بررسی ترکیبات لاشه از روش استاندارد (A.O.A.C. 2000) استفاده شد. رطوبت، از طریق خشک کردن نمونه‌ها در آون (مدلFD115 ، ساخت کمپانی BINDER آلمان) با دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. پروتیین خام نمونه‌ها از طریق تعیین نیتروژن کل به روش کلدال با استفاده از دستگاه بخش هضم مدل EBL و بخش تقطیر مدل VAP ساخت کمپانی Gerhardt آلمان تعیین شد. چربی خام نمونه‌ها از طریق حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به روش سوکسله به وسیله دستگاه سوکسله مدل VAP40 ساخت کمپانی Gerhardt آلمان انجام گرفت و خاکستر نمونه‌ها از طریق قرار دادن نمونه‌ها در کوره الکتریکی مدل LV/5/11/B170ساخت کمپانی Nabertherm آلمان در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورد استفاده در گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی	فیبر	خاکستر	فسفر کل	کلسیم	سدیم
درصد اجزاء جیره(٪)	۳۷	۱۴	۴	۱۰	۱/۲	۲	۰/۴

بررسی شاخص‌های خونی

در پایان دوره آزمایش پس از بیهوشی ماهیان با استفاده از پودر گل میخک اقدام به خونگیری با سرنگ از ساقه دمی بچه‌ماهیان گردید. جهت تعیین شاخص‌های خونی: تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC، نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت از روش‌های توصیف شده توسط هوستون (Houston, 1990) برای خون‌شناسی ماهیان استفاده شد. تعداد گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار مورد سنجش قرار گرفت. تعداد نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت با تهیه گسترش‌خونی و رنگامیزی آن با استفاده از گیمسا و سپس شمارش در زیر میکروسکوپ تعیین شد. هماتوکریت با استفاده از دستگاه میکروسانتریفیوژ محاسبه گردید. هموگلوبین با استفاده از کیت هموگلوبین و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. MCV، MCH و MCHC با استفاده از فرمول‌های ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

(MCV) حجم متوسط گلبولی (fl)

$$MCV = \frac{PCV \times 10}{RBC}$$

(MCH) هموگلوبین متوسط گلبولی (pg)

$$MCH = \frac{Hb \times 10}{RBC}$$

(MCHC) غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (٪)

$$MCHC = \frac{Hb \times 100}{PCV}$$

(RBC): تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون، (Hb): هموگلوبین و (PCV): هماتوکریت

بررسی فلور میکروبی روده

به منظور بررسی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت لاکتو-باسیلوس مصرفی در روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در انتهای دوره به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. (۲۴ ساعت قبل از نمونه-برداری تغذیه ماهیان قطع گردید). نمونه‌ها درمجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در آزمایشگاه ابتدا طول و وزن آنها با استفاده از خط‌کش و ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. برای از بین بردن باکتری‌های سطح بدن ماهی، نمونه ماهی در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد. سپس ناحیه شکمی ماهی با استفاده از تیغ جراحی استریل شکافته و روده آن پس از جداسازی، به هاون چینی استریل منتقل و توزین می‌گردد. سپس ۹ برابر وزن روده، محلول نمکی استریل نرمال (۰/۸۷ w/v Nacl درصد) به آن افزوده و هموژن می‌گردد.

پس ازتهیه نمونه هموژن با استفاده محلول نمکی استریل نرمال (۰/۸۷ w/v Nacl درصد) رقت‌های مختلف در دامنه 10^{-1}تا 10^{-8} تهیه و از رقت‌های مورد نظر تحت شرایط استریل، حجمی معادل ۰/۱ میلی لیتر برداشته و به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار برای کل باکتری‌ها و محیط کشت ام-آر-اس برای لاکتو باسیلوس‌ها منتقل و در سطح آن پخش گردید.

انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در شرایط هوازی انجام شد. تعداد باکتری‌ها در هر یک از نمونه‌ها براساس لگاریتم واحدکلنی[1] (تعداد کلنی×عکس ضریب رقیق‌سازی=CFU/g intestine) شمارش و تعیین شد (Mahious *et al*., 2005).

تجزیه و تحلیل آماری

تیمارها در قالب طرح کاملا" تصادفی هر تیمار با سه تکرارآماده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک، برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه[2] استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن و حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزارSPSS و Excel استفاده شد.

نتایج

فاکتورهای رشد

جدول ۲ مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود میزان ضریب تبدیل غذایی، کارایی پروتئین در تیمار ۴ و ۵ بهتر از سایر تیمارها بود و کم‌ترین آن در تیمار شاهد بود و این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). ولی بین دو تیمار ۴ و ۵ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵). همچنین بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه و افزایش وزن در تیمار ۴ مشاهده گردید که اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

ترکیبات لاشه

[1] Colony Forming Unit

[2] One-Way ANOVA

جدول ۳ نتایج مقایسه میانگین ترکیبات لاشه را درگروه‌های مختلف آزمایشی را نشان می‌دهد. بر اساس جدول، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر ترکیبات لاشه وجود ندارد (P>۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه در گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد

فاکتورها/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
وزن اولیه(گرم)	۱/۳۷± ۰/۱۱	۲/۴۲± ۰/۰۷	۲/۳۸± ۰/۰۴	۲/۴۲± ۰/۰۵	۲/۳۹± ۰/۰۲	۲/۳۷± ۰/۰۳
وزن انتهای دوره(گرم)	۲۹/۷۶± ۰/۳۱^{c}	۳۰/۶۱± ۰/۵۸^{ab}	۲۹/۲۴± ۱/۳۷^{c}	۳۱/۰۱± ۰/۹۹^{ab}	۳۶/۷۲± ۱/۵۷^{a}	۳۲/۱۰± ۱/۴۷^{b}
افزایش وزن(گرم)	۲۷/۳۹± ۰/۴۲^{b}	۲۸/۱۸± ۰/۵۸^{ab}	۲۶/۸۶± ۱/۳۸^{b}	۲۸/۵۹± ۱/۰۴^{ab}	۳۴/۳۲± ۱/۵۵^{a}	۲۹/۷۳± ۱/۴۶^{b}
نرخ رشد ویژه(٪درروز)	۴/۱۵± ۰/۱۰^{bc}	۴/۵۲± ۰/۰۶^{bc}	۴/۴۷± ۰/۰۹^{c}	۴/۵۵± ۰/۰۹^{bc}	۴/۸۷± ۰/۰۶^{a}	۴/۶۴± ۰/۰۷^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۲۳± ۰/۰۱^{a}	۱/۱۰± ۰/۰۱^{b}	۱/۲۶± ۰/۰۳^{a}	۱/۱۲± ۰/۰۳^{b}	۱/۰۴± ۰/۰۲^{c}	۱/۰۵± ۰/۰۲^{c}
کارایی	۲/۰۲± ۰ /۰۲^{c}	۲/۲۵± ۰/۰۳^{b}	۱/۹۸± ۰/۰۵^{c}	۲/۲۳± ۰/۰۵^{b}	۲/۳۹± ۰/۰۴^{a}	۲/۳۶± ۰/۰۵^{a}
پرتئین(گرم/گرم)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
بقاء(٪)						

*حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد(P<۰/۰۵).

* داده‌ها به صورت (SD ±میانگین) بیان شده است.

جدول ۳: مقایسه میانگین ترکیبات لاشه در گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد

فاکتورها/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
رطوبت(٪)	۷۲/۲۲±۱/۳۴	۷۱/۵۲±۲/۲۵	۷۲/۵۸±۰/۵	۷۲/۱۳±۱/۸۱	۷۱/۹۳±۱/۹۴	۷۱/۶۴±۱/۸۵
پرتئین(٪)	۱۶/۹۷±۰/۲۴	۱۷/۱۳±۰/۴۵	۱۶/۶۷±۰/۴۸	۱۶/۶۶±۰/۴۹	۱۷/۰۱±۰/۳۷	۱۶/۸۷±۰/۱۳
چربی(٪)	۷/۰۷±۰/۲	۶/۷۶±۰/۷۹	۶/۸۱±۰/۳۲	۶/۹۱±۰/۲	۶/۶۹±۰/۷۳	۶/۹۶±۰/۴۴
خاکستر(٪)	۳/۴۲±۰/۳۹	۳/۶۴±۰/۳۸	۳/۳۴±۰/۳۲	۳/۷۴±۰/۳۲	۳/۴۱±۰/۵۲	۳/۲۴±۰/۴۷

* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده ها می باشد(P<۰/۰۵).

* داده‌ها به صورت (SD ±میانگین) بیان شده است.

شاخص‌های خونی

با توجه به جدو ل ۴ و ۵ میزان گلبول سفید در تیمار ۴ به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد. ولی اختلاف معنی‌داری در میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت،MCV ، MCH و MCHC در بین گروه‌ها آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

فلور میکروبی روده

با توجه به جدول ۶ تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۴: مقایسه میانگین شاخص‌های خونی در گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد

شاخص‌های خونی/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
گلبول قرمز۱۰۶×	۱/۳۴±۰/۰۴	۱/۳۴±۰/۰۵	۱/۳۲±۰/۰۳	۱/۳۳±۰/۰۴	۱/۴±۰/۰۲	۱/۳۵±۱/۳۴
هموگلوبین	۹/۲۴±۰/۵۷	۹/۹۴±۰/۲۶	۹/۵۰±۰/۶۵	۱۰/۰۸±۰/۴۶	۹/۷۵±۰/۶۳	۹/۵۱±۰/۹۰
هماتوکریت	۳۵/۰۲±۰/۲۱	۳۵/۸۷±۰/۲۵	۳۵/۷۶±۰/۷۹	۳۵/۹۹±۰/۷۲	۳۶/۲۳±۰/۵۰	۳۶/۲۱±۰/۸۶
MCV	۲۶۰/۲۹±۸/۳۰	۲۶۶/۷۰±۱۲/۲۱	۲۶۹/۷۲±۹/۴۴	۲۶۹/۵۲±۱۳/۳۴	۲۵۸/۷۹±۲/۱۵	۲۶۷/۳۵±۱۶/۰۴
MCH	۶۸/۷۱±۴/۹۱	۷۳/۹۲±۴/۷۲	۷۱/۷۱±۶/۷۷	۷۵/۴۶±۴/۳۰	۶۹/۶۴±۳/۸۴	۷۰/۲۶±۸/۳۷
MCHC	۲۶/۳۹±۱/۴۸	۲۷/۷۰±۰/۵۷	۲۶/۵۶±۱/۸۰	۲۸/۰۲±۱/۶۵	۲۶/۹۲±۱/۷۰	۲۶/۲۶±۲/۴۰

* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد(P<۰/۰۵).

* داده‌ها به صورت (SD ±میانگین) بیان شده است.

جدول ۵: مقایسه میانگین تعداد لکوسیت‌ها و شمارش انواع آن در گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد

ترکیبات بدن/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
گلبول سفید۱۰۳×	۱۹/۹۳± ۱/۰۰^{d}	۲۱/۴۶± ۰/۹۸^{c}	۱۹/۸۳± ۱/۰۲^{d}	۲۱/۵± ۰/۵^{c}	۲۹/۹۳± ۰/۶۴^{a}	۲۳/۴۳± ۴/۱۶^{b}
لنفوسیت	۸۲/۳۳±۱/۵۲	۸۳/۰۰±۲/۶۴	۸۲/۰۰±۱/۰۰	۸۴/۳۳±۲/۰۸	۸۱/۶۶±۱/۱۵	۸۳/۶۶±۲/۰۸
نوتروفیل	۱۲±۱	۱۱/۶۶±۰/۵۷	۱۳/۰±۱/۰۰	۱۱/۳۳±۰/۵۷	۱۳/۰۰±۱/۰۰	۱۱/۶۶±۲/۰۸
مونوسیت	۵/۳۳±۱/۵۲	۵/۰۰±۱/۷۳	۵/۰۰±۱/۰۰	۴/۳۳±۱/۵۲	۵/۳۳±۱/۵۲	۴/۶۶±۲/۰۸

* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد(P<۰/۰۵).

* داده‌ها به صورت (SD ±میانگین) بیان شده است.

جدول ۶: مقایسه میانگین تعداد کل باکتری و باکتری‌های اسید لاکتیک روده در گروه‌های مختلف آزمایشی و گروه شاهد براساس (Log CFU/g)

فاکتورها/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
کل باکتری	۵/۸۴± ۰/۰۷^{c}	۶/۰۵± ۰/۱۱^{ab}	۵/۸۴± ۰/۰۷^{c}	۵/۹۸± ۰/۰۷^{bc}	۶/۱۷± ۰/۰۵^{a}	۶/۱۶± ۰/۰۷^{ab}
باکتری‌های اسید لاکتیک	۲/۹۸± ۰/۰۸^{d}	۳/۶۰± ۰/۱۳^{c}	۲/۹۲± ۰/۰۶^{d}	۳/۶۱± ۰/۰۳^{c}	۴/۶۰± ۰/۱۴^{a}	۴/۲۶± ۰/۰۸^{b}

* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد(P<۰/۰۵).

* داده‌ها به صورت (SD ±میانگین) بیان شده است.

بحث

امروزه برای مقابله با مشکلات ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که از جمله می‌توان به استفاده از مکمل‌های غذایی(پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌هاو آنزیم‌ها و... اشاره کرد که در بالا بردن توان ایمنی نقش عمده‌ای دارند، این مواد علاوه بر تامین مواد مغذی لازم، جهت تقویت رشد آبزیان، می‌توانند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا نیز مفید واقع می‌شوند (Vulevic *et al*., 2004).

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی و اسید آلی پتاسیم

سوربات به صورت معنی‌داری باعث بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه، از جمله افزایش رشد بدن، ضریب تبدیل غذای، کارایی پروتئین و نرخ رشد ویژه در بچه قزل‌آلای رنگین کمان شده که این نتایج در تیمار ۴ (ترکیب ۰/۵ درصد اسید آلی پتاسیم سوربات و $۱۰^{۷}$CFU/g پروبیوتیک *L. case*i) کاملا مشهود بوده است. مطالعات زیادی در ارتباط با نقش پروبیوتیک‌ها در عملکرد رشد و تغذیه وجود دارد (Andani *et al.*, 2012؛ Lara-Flores, 2011 ؛ Tukmechi *et al.*, 2011; Jafarzadeh *et al.*, 2015). پروبیوتیک‌ها به طرق مختلف برروی عملکرد رشد اثر می‌گذارند. از جمله افزایش قابلیت جذب مواد معدنی مانند کلسیم، سنتز ویتامین‌ها و پروتئین‌ها، بهبود تعادل میکروفلور روده (Rasdhari *et al.*, 2008)، تحریک و تولید آنزیم‌های گوارشی از جمله پروتئاز و آمیلاز، افزایش کارائی غذایی (Khan and Ansari, 2007) و تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره که اثرات مفیدی در کاهش باکتری‌های مضر و مهیا کردن شرایط برای رشد باکترهای مفید دارد (از طریق کاهش pH)، اشاره کرد. پروبیوتیک‌ها هنگام ورود به روده میزبان، به سطح روده متصل شده و از کربوهیدرات‌های موجود در محیط روده برای رشد و تولید شمار زیادی از آنزیم‌های هضم‌کننده، از جمله آمیلازها، پروتئازها و لیپازها استفاده می‌کنند و باعث افزایش هضم‌پذیری مواد غذایی شده، در نتیجه، باعث رشد بیش‌تر و جلوگیری از اختلالات روده‌ایی می‌شوند (Lara-Flores, 2011). همچنین نقش مثبت اسیدهای آلی در چند مطالعه (چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) (Ringo, 1991)، گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) (Owen *et al.*, 2006)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Pandey and Satoh, 2008) مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج این مطالعات نشان داده است که کارایی رشد ماهیان را با استفاده از برخی اسیدهای آلی می‌توان بالا برد. Ringo و Strom (۱۹۹۴) بیان نمودند جیره‌های حاوی اسیدلاکتیک و اسید پروپیونیک باعث افزایش وزن در ماهی چار (*Salvelinus alpinus*) در مقایسه با گروه شاهد (فاقد اسیدآلی) می‌شود. Sudagar و همکاران (۲۰۱۰) نیز طی مطالعه‌ای اعلام نمودند استفاده از اسید سیتریک (اسیدآلی) به عنوان ماده جاذب در جیره غذایی فیل ماهیان جوان به میزان ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم به ازای هر کیلوگرم جیره (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) باعث افزایش وزن نهایی و بهبود معنی‌دار نرخ رشد روزانه، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت و کاهش ضریب تبدیل غذایی می‌گردد. دلایل مختلفی برای افزایش کارایی رشد و تغذیه با استفاده از اسیدآلی می‌توان عنوان کرد. از جمله نقش اسیدهای‌آلی در کاهش بار میکروبی مضر در غذای مصرفی، استفاده از اسیدهای‌آلی در جیره و شروع فرایند هضم از خود جیره غذایی، کاهش pH معده و عملکرد بهتر پپسین، کاهش باکترهای مضر روده از طریق کاهش pH و متعادل سازی فلور میکروبی روده را نام برد (Luckstadt, 2008)، همچنین انرژی اسیدهای‌آلی می‌تواند به‌طور کامل در متابولیسم مورد مصرف قرار گیرد و سلول‌های اپتلیال روده از این مواد می‌توانند به‌عنوان منابع انرژی استفاده کنند و باعث رشد بیش‌تر سلول‌های انتروسیت روده گردند (Topping and Clifon, 2001) و درنتیجه افزایش اندازه ریزپرزهای روده و افزایش سطح جذب و به تبع آن کارائی بیش‌تر غذا را به دنبال خواهد داشت. مطالعات در زمینه اثرات سینرژیستی اسیدآلی و پروبیوتیک‌ها بسیار محدود است. Rodriguez-

Estrada و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان دادند، استفاده از ترکیب باکتری (*Enterococcus faecalis*) و اسیدآلی دی هیدروکسی بوتیرات باعث افزایش معنی‌دار شاخص-های رشد و تغذیه نسبت به سایر تیمارها می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج ما مطابقت دارد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد در چنین شرایطی پروبیوتیک *L. casei* استفاده شده (که از خانواده *Lactobacilli* است) در جیره غذایی تحت تاثیر اسیدآلی (پتاسیم سوربات) استفاده شده بقاء بهتری پیدا کرده باشد و فلور میکروبی روده را به سمت یک فلور متوازن و متعادل‌تر پیش برده باشد، کمااینکه بررسی فلور میکروبی روده در مطالعه حاضر این مورد را تایید می‌کند. در نهایت به نظر می-رسد مجموعه این عوامل باعث بهبود عملکرد هضم و جذب و کارائی غذا در بچه ماهیان مورد مطالعه شده باشد که به تبع آن بهبود فاکتورهای رشد در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در تیمارهای ترکیب پروبیوتیک *L. casei* و اسیدآلی پتاسیم سوربات به دنبال داشته است. نتایج حاصل از آنالیز لاشه در این تحقیق نشان داد که استفاده از اسیدآلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei* در تیمارهای مختلف تاثیر معنی-داری برکیفیت لاشه اعم از پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت نداشته است. برخی محققین بر این باورند که تغییرات در ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان می تواند به تغییرات در سنتز پروتئین و چربی در بدن، میزان ذخیره شان در بافت های بدن و نرخ رشد متفاوت، نسبت داده شود (Abdel-Tawwab *et al*., 2008; Heidarieh *et al*., 2012). اطلاعات موجود در مورد اثرات مفید جیره‌های حاوی پروبیوتیک ، اسیدهای‌آلی و نمک‌هایشان بروی کارایی رشد در ماهیان متناقض بوده و به نظر می‌رسد به عواملی همچون گونه ماهیان، اندازه و سن ماهیان، نوع و سطوح اسیدهای و نمک-هایشان و یا ترکیب آنها بستگی دارد. همچنین ترکیبات جیره‌های آزمایشی، ظرفیت بافری مواد تشکیل دهنده جیره، مدیریت پرورش و تغذیه و کیفیت آب از دیگر عوامل موثر می‌باشند (Lim *et al*., 2000). با توجه به اینکه درصد پروتئین، چربی و خاکستر لاشه در تیمارهای مختلف تغییر نکرده است ولی میزان کلی پروتئین و چربی و خاکستر در تیمارها بیش‌تر ازگروه شاهد است. چون میزان رشد (افزایش وزن) در تیمارهای ۴ (ترکیب ۰/۵ درصد اسیدآلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک(*L. casei*) نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر بوده است در نتیجه میزان کلی ابقاء پروتئین و چربی و خاکستر با توجه به افزایش وزن موجود بیش‌تر خواهد بود.

شاخص‌های خونی ماهیان تحت تاثیر عوامل مختلفی از قبیل گونه، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی، رژیم غذایی، کمیت و کیفیت غذا، مواد تشکیل دهنده جیره، منابع پروتئینی، ویتامین‌ها و محرک‌های رشد قراردارد (Merrifield, *et al*., 2010) وعلت تناقض داده‌های مربوط به اثر محرک‌های رشد بروی شاخص‌های خونی می‌تواند، موارد ذکر شده در بالا باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبولهای قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت،MCV، MCH وMCHC وجود ندارد ولی در تعداد گلبول‌های سفید این اختلاف نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است و این تفاوت در تیمار ۴ کاملا مشهود بوده. این نتایج با یافته‌های (Akrami, *et al*., 2007)، در ماهی قزل‌آلای

رنگین کمان (Hoseinifar, *et al*., 2011; Naseri *et al*., 2013; Modaberi *et al*., 2014)، در فیل ماهیان جوان مطابقت دارد. آنها در مطالعات خود نشان دادند که افزودن محرک‌های رشد به جیره‌های آزمایشی باعث افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه شاهد (بدون محرک رشد) می‌شود.

اگر چه حضور باکترهای اسیدلاکتیک در روده بسیاری از ماهیان از جمله ماهی کاد اطلس (*Labeo rohita*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فیل ماهی (*Huso huso*)، قره‌برون (*Acipenser persicus*) و چار قطبی (*Salvelinus alpinus*) ثابت شده است اما این باکتری‌ها جزء فلور غالب روده نیستند (Askarian, *et al*., 2009). امروزه ثابت شده است که میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی که با غلظت کم‌تر از 10^6 تا 10^7 CFU/g در فلور روده وجود داشته باشند، توانایی ایجاد تعادل بین جمعیت خود و باکتری‌های ساکن روده را نداشته، در نتیجه، نمی‌توانند فعالیت مناسب و اثر قابل قبولی بر سلامتی میزبان داشته باشند (Grama and Ringo, 2005; Pourgholam *et al*., 2017; Zare *et al*., 2017).

تلاش جهت افزایش تعداد و غالبیت باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق بکارگیری سویه‌های پروبیوتیکی عمدتا" به تشکیل کلنی پایدار و غالبیت در میکروبیوتای روده‌ای نشده است (Rurangwa, *et al*., 2009) ولی به نظر می‌رسد استفاده از موادی نظیر پربیوتیک، اسیدهای‌آلی قابلیت دستیابی به این مهم را دارا باشند. بررسی فلور میکروبی روده در این پژوهش نشان داد تعداد کل باکتری‌ها در تیمار۴ (ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L casei*) اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد ($P<0/05$). تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمارهای مختلف معنی‌دار بود ($P<0/05$). به‌طوری که به جز تیمار شاهد و تیمار۲ (۰/۵ درصد پتاسیم سوربات) که اختلاف معنی‌دار با هم نداشتند ($P>0/05$)، در سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار بود. و در تیمار ۴ (ترکیب ۰/۵ درصد اسید آلی پتاسیم سوربات و 10^7 CFU/g پروبیوتیک *L casei*)، بیش‌ترین میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک مشاهده شد. به نظر می‌رسد در تیمار ۴، وجود اثر هم‌افزایی مثبت، افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط روده را امکان‌پذیر کرده باشد. احتمالاً این اثر هم‌افزایی از طریق تاثیرات پتاسیم سوربات برروی pH محیط روده، تامین بخشی از انرژی مورد نیاز و شرایط محیطی مناسب (pH) برای باکتری‌های اسیدلاکتیک و محدودیت رشد برای باکتری‌های مضر (حساس به pH) روده امکان‌پذیر شده باشد که در نهایت پایداری باکتری‌های مفید (باکتری‌های اسیدلاکتیک) را در میکروبیوتای روده‌ای به دنبال داشته است (Cerezuela, *et al*., 2011).

در این پژوهش استفاده از ترکیب اسیدآلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei* باعث افزایش فاکتورهای رشد و تغذیه (افزایش رشد بدن، ضریب تبدیل غذای، کارایی پروتئین و نرخ رشد ویژه) و همچنین افزایش باکتری‌های مفید روده (باکتری‌های اسیدلاکتیک) در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد. از آنجایی که یکی از ارکان اصلی در مقرون به صرفه شدن پرورش ماهیان تجاری، افزایش بازده محصول و وضعیت سلامت ماهیان است.به نظر می‌رسد این نتایج می‌تواند به افزایش بهره‌وری اقتصادی (افزایش بازده

محصول و وضعیت سلامت ماهیان) در پروش تجاری ماهیان کمک کند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر حاجی بگلو به خاطر فراهم کردن امکانات اجرایی و مساعدت‌هایشان در انجام این طرح کمال تقدیر و تشکر را دارم.

منابع

1. Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael N.E.M., 2008. Evaluation of commercial live bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 280, 185–189.
2. Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H., 2007. Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Fish and Shelfish Immunology, 22(4), 394-402.
3. Akrami, R., Ghelichi, A., Ebrahimi, A., 2007. The effects of inulin as prebiotic on growth, survival and intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Proceeding of first national conference on fisheries sciences, Lahidjan, Iran, p. 20. (In Persian).
4. Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkini, S., Sheikhzadeh, N., 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology, 28, 728-734.
5. A.O.A.C., 2000. Official Methods of Analysis. Horwitz W. 18th edition 2000, Washington, DC.pp. 10-18.
6. Askarian, F., Kousha, A., Ringø E., 2009. Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Journal of Applied Ichthyology, 25, 91-94.
7. Bairagi, A., Ghosh, S.k., Sen, S.K., Ray, A.K., 2004. Evaluation of nutritive value of (*Leucana leucophala*) leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria (*Bacillus subtillis*) circulans in formulated diets of rohu (*Labeo rohita*) (Hamilton) fingerlings. Aquaculture Research, 35, 436-446.
8. Castillo, C., Benedito, J.L., Mendez, J., Pereira, V., Lopez-Alonso, M., Miranda, M., Hernandez, J., 2004. Organic acid as substitute for monesnsin in diets for beef cattle. Animal Feed Science and Technalogy, 115, 101-116.
9. Cerezuela, R., Meseguer, J., and Esteban, M, 2011. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture. A Review. Journal of Aquaculture Research and Development, 1, 1-7.
10. Eidelsburger, U., 1998. Feeding short-chain organic acids to pigs. In: Recent Advances in Animal Nutrition, Garnsworthy, P.C. and Wiseman, J. (Eds), Nottingham University press, Nottingham, 93-106.
11. FAO, 2002. The state of world fisheries and aquacultures. SOFIA, Rome, Italy, 150 p.
12. Gatlin, D.M., Li, P., Wang, X., Burr, G.S., Castille, F., Lawrnce, A.L., 2006. Potentiol application of prebiotics in aquaculture. 8th International symposium on aquaculture nutrition, 371-376.
13. Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2008. Dietary probiotic suoolementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. Aquaculture Nutrition, 14, 289-299.
14. Grama, L., Ringø, E., 2005. 17 Prospects of fish probiotics. Microbial ecology in growing animals, 2, 379.
15. Heidarieh, M., Mirvaghefi, A., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A., Behgar, M., 2012. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 38, 1169–1174.
16. Helland, S.J., Grisdale, B., Nerland, S., 1996. Asimple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. Aquaculture, 139,157-163.
17. Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., Hemer, G.I., 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutritionm, 11, 301-313.
18. Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L., Mojazi-Amiri, B., Yelghi S., Darvish-Bastami, K., 2011. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. Fish Physiology and Biochemistry, 37, 91-96.
19. Houston, A., 1990. Blood and circulation, In: Shreck CB, Moyle PB (Editors). Methods for

20. Jafarzadeh, E., Khara, H., Ahmadnezhad, M. 2015. Effects of Synbiotic (Biomin imbo) on haematological and immunological components of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti*. Comparative Clinical Pathology, 24(6) 1317-1323.
21. Khan, S.H., Ansari, F.A., 2007. Probiotics the friendly bacteria with market potential in global market. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(1), 71-76.
22. Lara-Flores, M., 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. International Research Journal of Microbiology, 2, 471-478.
23. Luckstadt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 3(44).
24. Lim, C, Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture, 185, 313-327.
25. Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture International, 14, 219-229.
26. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M., Ringo, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 302, 1-18.
27. Modaberi, A., Azari Takami, Gh., Behmanesh, Sh., Khara, H. 2014. Effects of different levels of Probiotic, Bactocell on growth performance, intestinal microflora and environmental stress on Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture Developmen, 7(4), 77/87.
28. Naseri, S., Khara, H., Shakoori, Sh. 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.
29. Owen, M.A.G., Waines, P., Bradley, G., Davies, S., 2006. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of Clarias gariepinus (Burchell 1822). Abstract from the 12th International Symposium Fish Nutrition and Feeding, May 28–June 1, 2006, Biarritz, France.
30. Pandey, A., Satoh, S., 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 74, 867–874.
31. Pourgholam, M. A., Khara, K., Safari, R., Yazdani Sadati, M. A., Aramli, M. M. 2017. Influence of Lactobacillus plantarum Inclusion in the Diet of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on Performance and Hematological Parameters. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17(1), 1-5.
32. Rahmati, Andani, H.R., Tukmechi, A., Meshkini, S., Ebrahimi, H., 2011. The increase of resistance of Rainbow trout against *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri* infection using *Lactobacillus* isolated from the intestine of common carp (*Cyprinus caipio*). Journal of Veterinary Iran, 2, 26-35.
33. Ramli, N., Heindl, U., Sunanto, S., 2005. Efect of potassium diformate on growth performance of tilapia challenged with (*Vibrio anguillarum*). Abstract, World Aquaculture, Bali, Indonesia.
34. Rasdhari, M., Parekh, T., Dave, N., Patel, V., Subhash, R., 2008. Evaluation of various physic-chemical Properties of (*Hibiscus safdariffa*) and (*Lactobacillus casei*) incorporated probiotic yogurt. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(17), 2101-2108.
35. Ringo, E., 1991. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). Aquaculture, 96, 321–333.
36. Ringo, E., Strom, E., 1994. Microflora of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. Aquaculture and Fisheries Management, 25, 623-629.
37. Romano, N., Koh, C.B., Ng, W.K., 2015. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against Vibrio harveyi in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 435, 228-236.
38. Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2009. Effects of Single and Combined Supplementation of *Enterococcus faecalis*, Mannan Oligosaccharide and Polyhydroxybutyrate Acid on Growth Performance and Immune Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Sciences, 57(4), 609-617.
39. Rurangwa, E., Laranja, J.L., Van-Houdt, R., Delaedt, Y., Geraylou, Z., Van-de-Wiele, T., fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 273-322.

2009. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono cultures in vitro. Journal of applied microbiology, 106, 932-40.

40. Sudagar, M., Hosseinpoor, Z. Hosseini, A., 2010. The use of citric acid as attractant in diet of grand sturgeon (*Huso huso*) fry and its effects on growing factors and survival rate. AACL Bioflux, 3, 311-316.
41. Suzer, C., oben, D., Kamaci, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Küksari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L) larvae Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280, 240-245.
42. Topping, D.L., Clifon, P.M., 2001. Short chain fatty acids and human colonic function. roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. Physiological Reviews, 81, 1031–1064.
43. Tukmechi, A., Rahmati-Andani, H.R., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N., 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated Saccharomyces cerevisiae enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 30, 923-928.
44. Vielma, J., Ruohonen, K., Lall, S.P., 1999. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). Aquaculture Nutrition, 5, 65–71.
45. Vulevic, J., Rastall, R.A., Gibson, G.R., 2004. Developing a quantitation approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharids. FEMS Microbiology Letters, 236, 153-159.
46. Wing-Keong, N., Chik-Boon, C., Kumar, S., Siti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia (*Oreochromis sp*) and subsequent survival during a challenge test with (*Streptococcus agalactiae*). Aquaculture Research, 40, 1490-1500.
47. Zare, A., Azari Takami, Gh., Tari dashti, F., Khara, H. 2017. The effects of *Pediococcus acidilactici* as a probiotic on growth performance and survival rate of great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Iranian journal of fisheries science, 16(1) 150-161.