

## 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<sup>۱\*</sup>، امیر توکمه چی<sup>۲</sup>، ابراهیم حسین نجدگرمی<sup>۲</sup>، عبدالمجید حاجی مرادلو<sup>۲</sup>، فرزانه نوری<sup>۲</sup>

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 پذیرش: ۱۴ اسفند ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱ آبان 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  $0.05 \pm 0.005$  گرم، آزمایشی به مدت ۸ هفته با به‌کارگیری شش تیمار، شامل: تیمار شاهد، جیره حاوی  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات (تیمار ۲)، جیره حاوی ۱ درصد پتاسیم سوربات (تیمار ۳)، جیره حاوی ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۴) و جیره حاوی ترکیب ۱ درصد پتاسیم سوربات و  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۵) صورت پذیرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و کارایی 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 در تیمار ۴ به طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود ( $P < 0.05$ )، ولی اختلاف معنی‌داری در میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، MCH، MCV و MCHC مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). بررسی تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد به طوری 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:** قزل‌آلای رنگین کمان، پتاسیم سوربات، *Lactobacillus casei*

## 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). آبرزی پروری به عنوان یک راه کار اساسی، می تواند از طریق تأمین پروتئین مورد نیاز انسان، نقش مهمی را در این زمینه ایفا کند. هدف نهایی در انواع مختلف فعالیت های آبرزی پروری، افزایش بازده تولید، جهت به حداکثر رساندن سوددهی می باشد. یکی از روش های افزایش تولید در آبرزی پروری، کنترل بیماری بوده که در این زمینه، می توان به استفاده از داروهای ضد میکروبی (آنتی بیوتیک ها) اشاره کرد، متأسفانه مصرف طولانی مدت این ترکیبات سبب ایجاد مشکلاتی عمده ایی از جمله، مقاوم شدن عوامل بیماری زا، تغییر فلور میکروبی روده (که در سلامت میزبان نقش بالقوه ایی دارند) به سمت یک فلور نامتعادل، کاهش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، انتقال این مواد در نهایت به انسان، آلودگی های زیست محیطی و افزایش هزینه های جاری تولید ماهی می گردد (Gatlin *et al.*, 2006). از جمله ترکیباتی که به عنوان جایگزین مواد ضد میکروبی مطرح می باشد می توان به اسیدهای آلی اشاره کرد (Luckstadt, 2008).

طبق تعریف سازمان خوار و بار جهانی<sup>۱</sup> و سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیک ها میکروارگانیزم های زنده ای هستند که اگر به میزان مناسب مورد استفاده قرار گیرند می توانند سبب بهبود وضعیت سلامت میزان شوند (Ghosh *et al.*, 2008). از جمله مزایای استفاده از پروبیوتیک ها می توان به بهبود جذب کلسیم، سنتز ویتامین ها، پروتئین ها و بهبود تعادل میکروفلور روده

(Rasdhari *et al.*, 2008)، تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول سرم خون، افزایش کارایی غذایی (که این امر از طریق تولید ویتامین ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب و نیز تولید آنزیم های گوارشی) اشاره کرد (Khan and Ansari, 2007). با این حال زنده ماننی پایین باکتری های پروبیوتیکی در دستگاه گوارش و توانایی تحمل شرایط حاکم بر آن از مشکلات کاربرد این میکروارگانیزم ها در صنعت آبرزی پروری است (Mahious *et al.*, 2005).

اسیدهای آلی 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 می باشند (Eidelsburger, 1998). همه ی اسیدهای آلی به طور طبیعی در بافت سبزیجات مختلف و حیوانات وجود دارند، بنابراین به طور طبیعی می توانند در مواد غذایی به عنوان یک فرآیند طبیعی متابولیسمی بیوشیمیایی ظاهر شده و یا مستقیماً به عنوان اسیدی کننده، هیدرولیز کننده رشد باکتری ها به تولیدات غذایی اضافه گردند. امروزه، توجه ویژه ای به کاربرد تجاری اسیدهای آلی در جیره ماهیان و سایر جانداران در جهت کنترل بیماری ها و افزایش کارایی رشد صورت می گیرد. محققین گزارش کرده اند که چندین اسید آلی، نمک ها و ترکیبات متعلق آنها می توانند موجب افزایش رشد، مصرف غذا و مقاومت در برابر بیماری در ماهیان گردند (Wing-Keong *et al.*, 2009).

با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک ها و اسیدهای آلی در صنعت آبرزی پروری از جمله: (Rahmati Andani, Suzer, *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2011

<sup>۱</sup> Food and Agriculture Organization

آلمان) با دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 اسپکتروفوتومتر، 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 قزل آلائی رنگین کمان با وزن اولیه  $2/75 \pm 0/05$  گرم استفاده شدند. که در ۶ تیمار جیره‌ای شامل: جیره تجاری (تیمار شاهد)، جیره حاوی  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات (تیمار ۲)، جیره حاوی ۱ درصد پتاسیم سوربات (تیمار ۳)، جیره حاوی ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۴) و جیره حاوی ترکیب ۱ درصد پتاسیم سوربات و  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei* (تیمار ۵) 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 قزل آلائی رنگین کمان (غذای بهدانه شمال، شهرک صنعتی میرود بابلسر) استفاده شد و برای تیمارهای آزمایشی، باکتری و اسید آلی، پس از آماده سازی بصورت اسپری به غذا اضافه و برای کاهش میزان آبشویی از ژلاتین ۴ درصد استفاده گردید. بچه ماهیان به مدت دو ماه و روزانه ۳ بار غذادهی شدند (ساعت ۸

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 اسید آلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei* در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان انجام شد.

### مواد و روش

#### اسیدهای آلی مورد استفاده

اسید آلی مورد استفاده در این تحقیق پتاسیم سوربات با فرمول شیمیایی  $CH_3CH=CHCH=CHCOOK$  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 به صورت 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 سانتی گراد قرار داده شد. پس از رشد باکتری، برای حذف محیط کشت در ساترئیفیوژ یخچال دار (مدل 5810R ساخت کمپانی eppendorf

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/B170 ساخت کمپانی Nabertherm آلمان در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

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 (Hevroy, 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 (مدل FD115، ساخت

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

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 اسپکتروفوتومتر 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)

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

### 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 گسترش خونی و رنگامیزی

یک از نمونه‌ها براساس لگاریتم واحد کلنی<sup>۱</sup> (تعداد کلنی × عکس ضریب رقیق‌سازی = CFU/g intestine) شمارش و تعیین شد (Mahious et al., 2005).

### تجزیه و تحلیل آماری

تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی هر تیمار با سه تکرار آماده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک، برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه<sup>۲</sup> استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن و حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS و Excel استفاده شد.

### نتایج

#### فاکتورهای رشد

جدول ۲ مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. همان‌گونه 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 ( $P < 0.05$ ). ولی بین دو تیمار ۴ و ۵ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). همچنین بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه و افزایش وزن در تیمار ۴ مشاهده گردید که اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ).

#### ترکیبات لاشه

(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 رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف در انتهای دوره به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. (۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری تغذیه ماهیان قطع گردید). نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در آزمایشگاه ابتدا طول و وزن آنها با استفاده از خط کش 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 از تهیه 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 میلی‌لیتر برداشته و به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار برای کل باکتری‌ها و محیط کشت ام-آر-اس برای لاکتوباسیلوس‌ها 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

<sup>۱</sup> Colony Forming Unit

<sup>۲</sup> One-Way ANOVA

اساس جدول، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر ترکیبات لاشه وجود ندارد ( $P > 0.05$ ).

جدول ۳ نتایج مقایسه میانگین ترکیبات لاشه را در گروه‌های مختلف آزمایشی را نشان می‌دهد. بر

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 <sup>c</sup>	۳۰/۶۱ ± ۰/۵۸ <sup>ab</sup>	۲۹/۲۴ ± ۱/۳۷ <sup>c</sup>	۳۱/۰۱ ± ۰/۹۹ <sup>ab</sup>	۳۶/۷۲ ± ۱/۵۷ <sup>a</sup>	۳۲/۱۰ ± ۱/۴۷ <sup>b</sup>
افزایش وزن (گرم)	۲۷/۳۹ ± ۰/۴۲ <sup>b</sup>	۲۸/۱۸ ± ۰/۵۸ <sup>ab</sup>	۲۶/۸۶ ± ۱/۳۸ <sup>b</sup>	۲۸/۵۹ ± ۱/۰۴ <sup>ab</sup>	۳۴/۳۲ ± ۱/۵۵ <sup>a</sup>	۲۹/۷۳ ± ۱/۴۶ <sup>b</sup>
نرخ رشد ویژه (%/درروز)	۴/۱۵ ± ۰/۱۰ <sup>bc</sup>	۴/۵۲ ± ۰/۰۶ <sup>bc</sup>	۴/۴۷ ± ۰/۰۹ <sup>c</sup>	۴/۵۵ ± ۰/۰۹ <sup>bc</sup>	۴/۸۷ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۴/۶۴ ± ۰/۰۷ <sup>b</sup>
ضریب تبدیل غذایی	۱/۲۳ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۱/۱۰ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>	۱/۲۶ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۱۲ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>	۱/۰۴ ± ۰/۰۲ <sup>c</sup>	۱/۰۵ ± ۰/۰۲ <sup>c</sup>
کارایی	۲/۰۲ ± ۰/۰۲ <sup>c</sup>	۲/۲۵ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>	۱/۹۸ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۲/۲۳ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۲/۳۹ ± ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۲/۳۶ ± ۰/۰۵ <sup>a</sup>
پرتین (گرم/گرم)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
بقاء (%)						

\* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

\* 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 ± ۰/۰۵	۷۲/۱۳ ± ۱/۸۱	۷۱/۹۳ ± ۱/۹۴	۷۱/۶۴ ± ۱/۸۵
پرتین (%)	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 ± ۰/۰۲	۶/۷۶ ± ۰/۷۹	۶/۸۱ ± ۰/۳۲	۶/۹۱ ± ۰/۰۲	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 نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

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

### شاخص‌های خونی

با توجه به جدول ۴ و ۵ میزان گلبول سفید در تیمار ۴ به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود ( $P < 0.05$ ) 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 ( $P > 0.05$ ).

### فلور میکروبی روده

با توجه به جدول ۶ تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ( $P < 0.05$ ).

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

شاخص‌های خونی/تیمارها	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵
گلبول قرمز $\times 10^6$	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 ( $P < 0.05$ ).

\* 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 سفید $\times 10^3$	۱۹/۹۳±۱/۰۰ <sup>d</sup>	۲۱/۴۶±۰/۹۸ <sup>c</sup>	۱۹/۸۳±۱/۰۲ <sup>d</sup>	۲۱/۵±۰/۵ <sup>c</sup>	۲۹/۹۳±۰/۶۴ <sup>a</sup>	۲۳/۴۳±۴/۱۶ <sup>b</sup>
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 ( $P < 0.05$ ).

\* 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 <sup>c</sup>	۶/۰۵±۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۵/۸۴±۰/۰۷ <sup>c</sup>	۵/۹۸±۰/۰۷ <sup>bc</sup>	۶/۱۷±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۶/۱۶±۰/۰۷ <sup>ab</sup>
باکتری‌های اسید لاکتیک	۲/۹۸±۰/۰۸ <sup>d</sup>	۳/۶۰±۰/۱۳ <sup>c</sup>	۲/۹۲±۰/۰۶ <sup>d</sup>	۳/۶۱±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۴/۶۰±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۴/۲۶±۰/۰۸ <sup>b</sup>

\* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین داده‌ها می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

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

## بحث

این مواد علاوه بر تامین مواد مغذی لازم، جهت تقویت رشد آبریان، 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

امروزه برای مقابله با مشکلات ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که از جمله می‌توان به استفاده از مکمل‌های غذایی (پروبیوتیک‌ها، پریبیوتیک‌ها و آنزیم‌ها و ... اشاره کرد که در بالا بردن توان ایمنی نقش عمده‌ای دارند،

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 اسید آلی) می‌شود. Sudagar و همکاران (۲۰۱۰) نیز طی مطالعه‌ای اعلام نمودند استفاده از اسید سیتریک (اسید آلی) 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 معنی دار 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 اسید آلی می‌توان عنوان کرد. از جمله نقش اسیدهای آلی در کاهش بار میکروبی مضر در غذای مصرفی، استفاده از اسیدهای آلی 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 اسیدهای آلی 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 Clifton, 2001) و در نتیجه افزایش اندازه ریزپرزهای روده و افزایش سطح جذب و به تبع آن کارایی بیش‌تر غذا را به دنبال خواهد داشت. مطالعات در زمینه اثرات سینرژیستی اسید آلی و پروبیوتیک‌ها بسیار محدود است. Rodriguez-

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  $10^6$  CFU/g پروبیوتیک *L. casei*) کاملاً مشهود بوده است. مطالعات زیادی در ارتباط با نقش پروبیوتیک‌ها در عملکرد رشد و تغذیه وجود دارد (Andani et al., 2012؛ Tukmechi et al., 2011؛ Lara-Flores, 2015؛ Jafarzadeh et al., 2011). پروبیوتیک‌ها به طرق مختلف بر روی 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 کارایی 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 روده‌ای 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 رنگین کمان (Pandey and Satoh, 2008)

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 بیش تر از گروه شاهد است. چون میزان رشد (افزایش وزن) در تیمارهای ۴ (ترکیب ۰/۵ درصد اسید آلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei*) نسبت به سایر تیمارها بیش تر بوده است در نتیجه میزان کلی ابقاء پروتئین و چربی و خاکستر با توجه به افزایش وزن موجود بیش تر 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 قرار دارد (Merrifield, et al., 2010) و علت 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، و MCHC وجود ندارد ولی در تعداد گلبول‌های سفید این اختلاف نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است و این تفاوت در تیمار ۴ کاملاً مشهود بوده. این نتایج با یافته‌های (Akrami, et al., 2007)، در ماهی قزل‌آلای

Estrada و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان دادند، استفاده از ترکیب باکتری (*Enterococcus faecalis*) و اسید آلی 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 اسید آلی (پتاسیم سوربات) استفاده شده بقاء بهتری پیدا کرده باشد و فلور میکروبی روده را به سمت یک فلور متوازن و متعادل تر پیش برده باشد، کمالینکه بررسی فلور میکروبی روده در مطالعه حاضر این مورد را تایید می‌کند. در نهایت به نظر می‌رسد مجموعه این عوامل باعث بهبود عملکرد هضم و جذب و کارایی 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 اسید آلی پتاسیم سوربات به دنبال داشته است. نتایج حاصل از آنالیز لاشه در این تحقیق نشان داد که استفاده از اسید آلی پتاسیم سوربات و پروبیوتیک *L. casei* در تیمارهای مختلف تاثیر معنی-داری بر کیفیت لاشه اعم از پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت نداشته است. برخی محققین بر این باورند که تغییرات در ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان می‌تواند 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، اسیدهای آلی و نمک‌هایشان بروی کارایی رشد در ماهیان متناقض

*casei* اختلاف معنی داری با سایر تیمارها دارد ( $P < 0/05$ ). تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمارهای مختلف معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). به طوری که به جز تیمار شاهد و تیمار ۲ (۵/۰ درصد پتاسیم سوربات) که اختلاف معنی دار با هم نداشتند ( $P > 0/05$ ), در سایر تیمارها اختلاف معنی دار بود. و در تیمار ۴ (ترکیب ۵/۰ 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 بر روی 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

رنگین کمان (Hoseinifar, et al., 2011; Naseri et al., 2014; 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 معنی داری 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 میکروارگانسیم‌های 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 غالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق بکارگیری سویه‌های پروبیوتیکی عمدتاً "به تشکیل کلنی پایدار و غالیت در میکروبیوتای روده‌ای نشده است" (Rurangwa, et al., 2009) ولی به نظر می‌رسد استفاده از موادی نظیر پروبیوتیک، اسیدهای آلی قابلیت دستیابی به این مهم را دارا باشند. بررسی فلور میکروبی روده در این پژوهش نشان داد تعداد کل باکتری‌ها در تیمار ۴ (ترکیب ۵/۰ درصد پتاسیم سوربات و  $10^7$  CFU/g پروبیوتیک *L.*

8. Castillo, C., Benedito, J.L., Mendez, J., Pereira, V., Lopez-Alonso, M., Miranda, M., Hernandez, J., 2004. Organic acid as substitute for monensin in diets for beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 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., Lawrance, A.L., 2006. Potential application of prebiotics in aquaculture. 8th International symposium on aquaculture nutrition, 371-376.
13. Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2008. Dietary probiotic supplementation 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., Gridale, B., Nerland, S., 1996. A simple 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 Nutrition*, 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*

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

### سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر حاجی بگلو به خاطر فراهم کردن امکانات اجرایی و مساعدت هایشان 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  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish and Shellfish 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 subtilis*) circulans in formulated diets of rohu (*Labeo rohita*) (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 35, 436-446.

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. Effect 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 physico-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.
20. Jafarzadeh, E., Khara, H., Ahmadnezhad, M. 2015. Effects of Synbiotic (Biomimbo) on haematological and immunological components of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadtii*. *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 (*Oncorhynchus 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) fry. *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.

- 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.
  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., Clifton, 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*