شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۸۸-۷۷

بررسی اثرات تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با سین بیوتیک بر شاخصهای رشد، جمعیت میکروبی روده و مقاومت در برابر استرس ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*)

محمود عظیمی راد*[۱]، سعید مشکینی[۲]، نصرالله احمدی فرد[۳]، سید حسین حسینی فر[۴]

۱. دانشجوی دکترای تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۲۲

چکیده

در سالهای اخیر استفاده از ترکیبات سین بیوتیک در جیره غذایی جهت بهبود شاخصهای رشد، ایمنی و فیزیولوژی آبزیان بسیار مورد توجه بوده است. در تحقیق حاضر تاثیر آرتمیا فرانسیسکانای (*Artemia franciscana*) بالغ غنی شده با سین بیوتیک (ترکیب پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید) بر شاخصهای رشد، جمعیت میکروبی روده و مقاومت در برابر استرسهای محیطی در ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی آنجل با وزن اولیه ۰/۱۳ ± ۳/۲ گرم انتخاب و در ۱۲ آکواریوم ۵۰ لیتری در چهار تیمار با سه تکرار به صورت تصادفی تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۴۸ روز با تیمارهای غذایی شامل تیمار۱: تغذیه با آرتمیای بالغ بدون غنی سازی (شاهد)، تیمار۲: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* (۷۰۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار۳: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید (۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار۴: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با سین بیوتیک (۷۰۰ میلی گرم در لیتر *P. acidilactici* و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید) مورد تغذیه قرار گرفتند. بررسی شاخصهای رشد، جمعیت میکروبی روده در شروع و انتهای آزمایش و مقاومت ماهی در برابر استرسهای محیطی (کاهش درجه حرارت و افزایش شوری حاد) در انتهای آزمایش انجام گرفت. استفاده از سین بیوتیک به صورت معنی داری باعث بهبود شاخصهای رشد نسبت به سایر تیمارها گردید (P <۰/۰۵). بیشترین افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار سین بیوتیک دیده شد. بیشترین میزان جمعیت میکروبی باکتریهای اسید لاکتیک روده در انتهای آزمایش در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد که با دیگر تیمارها اختلاف معنی داری داشت (P <۰/۰۵). حداکثر مقاومت ماهی در برابر استرس کاهش درجه حرارت (۱۷ درجه سانتی گراد) و افزایش شوری (۱۲ گرم در لیتر) در انتهای آزمایش در تیمار سین بیوتیک مشاهده گردید. این تحقیق نشان داد غنی سازی آرتمیا با سین بیوتیک نتایج بهتری نسبت به استفاده جداگانه پروبیوتیک یا پری بیوتیک در ماهی آنجل دارد.

واژگان کلیدی: سین بیوتیک، آرتمیا، ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*)، جمعیت میکروبی، استرس

* نویسنده مسئول مکاتبه تلفن: ۰۹۱۹۶۰۵۸۵۵۲ Email: mahmoodazimirad@gmail.com

۱. مقدمه

استقبال روز افزون بشر از ماهیان زینتی موجب شده که این صنعت از اهمیت و جایگاه ویژه ای برخوردار شود. به دلیل تقاضای بالا و فشار روی منابع طبیعی، پرورش مصنوعی این ماهیان در چند دهه گذشته توسعه پیدا کرده است (Sales and Janssens, 2003). پرورش دهندگان صنعتی ماهیان زینتی علاوه بر غذای فرموله شده، غذای زنده را نیز در مراحل مختلف زندگی آنها استفاده می کنند تا رشد، هم آوری، ضریب تبدیل غذایی و رنگ بهتری را داشته باشند (Kruger *et al*., 2001).

ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) یکی از رایج ترین گونه های آکواریومی آب شیرین است که از لحاظ ارزش تجاری در مقایسه با دیگر گونه های زینتی در رتبه بالایی قرار دارد (Tamaru and Ako, 2000). رژیم غذایی ماهی آنجل در شرایط طبیعی شامل جلبک های تک سلولی، سخت پوستان، لارو حشرات، گیاهان آبزی و برخی از نرمتنان می باشد. در شرایط پرورشی، غذای مناسب برای این ماهی در چهار هفته اول زندگی، ناپلیوس آرتمیا و در ادامه غذای مصنوعی تجاری به همراه آرتمیای بالغ می باشد (Sales and Janssens, 2003). با توجه به اهمیت تغذیه در تکثیر و پرورش این گونه در شرایط متراکم، تحقیقات و توسعه کمی در این زمینه صورت گرفته است.

در بین غذاهای زنده مورد استفاده در پرورش ماهیان زینتی، آرتمیا به صورت گسترده ای مورد استقبال قرار گرفته است. دلیل این امر به خاطر ارزش غذایی بالا، اندازه مناسب و امکان غنی سازی آن می باشد (Sorgeloos *et al*., 2001). آرتمیا می تواند به عنوان ناقل عواملی مانند مواد مغذی (اسیدهای چرب، ویتامینها و غیره)، مواد ضد میکروبی، واکسن و پروبیوتیکها در پرورش آبزیان مورد استفاده قرار گیرد (Gatesoupe, 1994). اضافه کردن باکتری زنده مفید و غیر بیماری زا به محیط کشت یا پرورش آرتمیا و استفاده آن در تغذیه ماهی می تواند اثرات مثبتی بر ماهی پرورشی با بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش، از بین بردن باکتریهای مضر و بهبود ارزش غذایی آرتمیا داشته باشد (Ringø *et al*., 1992).

در سالهای اخیر استفاده از پروبیوتیکها در آبزی پروری به شدت رواج پیدا کرده است (Merrifield *et al*., 2010). استفاده از پروبیوتیکها به عنوان مکمل غذایی به دهه ۱۹۷۰ برمی گردد (Fuller, 1989). انواع مختلفی از میکروآلگها (*Tetraselmis*)، مخمرها (*Phaffia, Saccharomyces*)، باکتریهای گرم مثبت (*Bacillus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Micrococcus, Streptococcus & Weissella*) و باکتریهای گرم منفی (*Aeromonas, Alteromonas, Photorhodobacterium, Pseudomonas & Vibrio*) به عنوان پروبیوتیک بررسی شده اند (Gatesoupe *et al*., 2010). استفاده هم زمان گونه های پروبیوتیکی به همراه پری بیوتیکهای مناسب به صورت ترکیب سین بیوتیک جهت رشد پایدار باکتریهای پروبیوتیکی و حفظ غالبیت در میکروفلور آبزیان پیشنهاد شده است (Hoseinifar *et al*., 2015).

در خصوص استفاده از سین بیوتیک در تغذیه آبزیان مطالعات محدودی انجام شده و اثرات مثبت آن بر فیزیولوژی و ایمنی بدست آمده است (Merrifield *et al*., 2010; Abid *et al*., 2013). با این وجود بکارگیری سین بیوتیکها در مراحل ابتدایی حیات ماهیها از طریق غنی سازی غذای زنده و اثرات آن بر رشد، فیزیولوژی و ایمنی تاکنون به طور جدی و وسیع مورد توجه قرار نگرفته است. استفاده از سین بیوتیک در آرتمیا علاوه بر اینکه می تواند به عنوان یک ماده غذایی مناسب برای آرتمیا مطرح باشد، می تواند بر فلور میکروبی روده ای، سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در برابر باکتری بیماریزا، افزایش سلامت و کاهش خطر ابتلا به بیماری و تلفات بچه ماهی تاثیر گذار باشد. هدف از این تحقیق تاثیر غنی سازی آرتمیای بالغ با سین بیوتیک با ترکیب پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید بر شاخصهای رشد، جمعیت میکروبی روده و مقاومت در برابر استرسهای محیطی بچه ماهی آنجل بود.

۲. مواد و روشها

۱.۲. نحوه پرورش و غنی سازی آرتمیای بالغ

سیست آرتمیای مورد استفاده در این تحقیق مربوط به گونه *Artemia franciscana* تهیه شده از شرکت Great Salt آمریکا بود. لایه کوریون سیستها با به کارگیری هیپوکلریت سدیم طی فرآیند کپسول زدایی، جدا شدند. تخم گشایی سیستهای کپسول زدایی شده از طریق به کارگیری ظرف مخروطی شکل با حجم ۱۲۰ لیتر با استفاده از آب دریا (شوری ۳۰ گرم در لیتر) انجام پذیرفت. سیستها با تراکم ۵ گرم در لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با شرایط نوری ۲۰۰۰ لوکس و هوادهی شدید انکوباسیون گردیدند (Soltanian *et al*., 2007).

ناپلیهای آرتمیا بعد از تفریخ به محیط پرورش انتقال پیدا کردند. محیط پرورشی شامل ظروف پلاستیکی مخروطی شکل به حجم ۱۵۰ لیتر که توسط لوله های هوادهی متصل به پمپ مرکزی هوادهی شدند. ناپلی آرتمیا در طی چند روز اول از پودر جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) خشک شده تغذیه شده و در ادامه ترکیبی از سبوس برنج، مخمر نان و جلبک اسپیرولینا بود. غذادهی سه مرتبه در روز با فاصله چهار ساعت یکبار انجام گرفت. تراکم پرورش، سه ناپلی در هر میلی لیتر و دوره پرورش ۲۰ روز بود تا آرتمیا به بلوغ جنسی برسد (Teresita *et al*., 2005). فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل دمای آب، شوری، اکسیژن محلول در آب، نور و pH در طول دوره پرورش به ترتیب ۲۸/۶۹ درجه سانتی گراد، ۳۲ گرم در لیتر، ۷/۷۵ میلی گرم در لیتر، ۱۵۰۰ لوکس و ۷/۸۸ بود.

پروبیوتیک تجاری مورد استفاده در این آزمایش از شرکت تک ژن با نام تجاری پدی گارد (Pedi-guard) حاوی باکتری *P. acidilactici* به میزان 1×10^{10} CFU/g تهیه شد. همچنین پری بیوتیک مورد استفاده فروکتوالیگوساکارید (Raftilose P95) بود که از شرکت Orafti بلژیک تامین شد.

جهت غنی سازی آرتمیای بالغ با سین بیوتیک طبق جدول ۱ ترکیبی از پروبیوتیک و پری بیوتیک استفاده گردید. جهت تهیه سوسپانسیون، ابتدا به نسبت ۰/۱ به ۱۰ به ترتیب لسیتین و آب با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد درون بشر خشک و تمیز ریخته و با استفاده از همزن برقی مخلوط شدند. سپس روغن کلزا به این محلول اضافه شده و با استفاده از همزن به خوبی مخلوط شدند. نسبت لسیتین، روغن و آب در سوسپانسیون به ترتیب ۰/۱، ۱ و ۱۰ بود. جهت بررسی قطر ذرات روغن، مقداری نمونه روی لام ریخته و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید (Ghaderpour *et al*., 2013). از سوسپانسیون تهیه شده ۱۵۰ میلی لیتر جدا گردیده، ۷۰۰ میلی گرم پروبیوتیک *P. acidilactici* و ۱۰۰ میلی گرم پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید به بشر انتقال داده شده و با دستگاه همزن برقی به خوبی مخلوط شد. سپس سوسپانسیون را در ظرف حاوی دو لیتر آب دریا مخلوط کرده و آرتمیای بالغ به تعداد ۴۰۰۰ عدد جهت غنی سازی اضافه گردید (Daniels *et al*., 2013).

برای بررسی چگونگی روند غنی سازی، از تمامی تیمارها با استفاده از پی پت استریل میزان ۱۰۰ میلی لیتر (حاوی ۰/۵ گرم آرتمیای بالغ) نمونه برداری صورت گرفت. شمارش باکتریهای غنی شده در آرتمیا در آزمایشگاه انجام شده و بر حسب لگاریتم واحد کلنی (تعداد کلنیهای باکتریایی رشد یافته بر روی محیط کشت × عکس ضریب رقیق سازی) در هر گرم آرتمیا ثبت شد (Rengpipat *et al*., 1998). بر اساس مشخصات ظاهری، رنگ آمیزی گرم و نیز برخی از آزمونهای بیوشیمیایی استاندارد نظیر فنل رد، سیترات، ایندول، حرکت و متیل رد، باکتری *P. acidilactici* بررسی و مورد شناسایی قرار گرفت (Peter and Sneath, 1986).

جدول ۱- میزان و نحوه غنی سازی آرتمیای بالغ در تیمارهای مختلف (میلی گرم در لیتر)

تیمارها	سوسپانسیون روغن کلزا	پروبیوتیک *P. acidilactici*	پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید
شاهد (T_1)	۱۵۰	۰	۰
پروبیوتیک (T_2)	۱۵۰	۷۰۰	۰
پری بیوتیک (T_3)	۱۵۰	۰	۱۰۰
سین بیوتیک (T_4)	۱۵۰	۷۰۰	۱۰۰

۲.۲. طرح آزمایش و تیمارها

جهت بررسی کارایی تغذیه آرتمیا با سین بیوتیک و اثر آن بر سلامت ماهی، از ماهی آنجل به وزن متوسط ۰/۱۳ ± ۳/۲ گرم استفاده گردید. ماهیان استفاده شده در این آزمایش دارای شرایط تفریخ و لاروی مشابه بودند. ماهیها به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط پرورش نگهداری شدند و پس از سازگاری ماهیان با شرایط آزمایشگاهی، ۳۶۰ قطعه ماهی در ۱۲ آکواریوم با حجم ۵۰ لیتر (تراکم ۳۰ قطعه در هر مخزن) و در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تیمار و با سه تکرار توزیع گردیدند.

۳.۲. شرح آزمایش

ماهیان به مدت ۴۸ روز با تیمارهای غذایی شامل تیمار۱: تغذیه با آرتمیای بالغ بدون غنی سازی (شاهد)، تیمار۲: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* (۷۰۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار۳: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید (۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار۴: تغذیه با آرتمیای بالغ غنی شده با سین بیوتیک (۷۰۰ میلی گرم در لیتر *P. acidilactici* و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید) مورد تغذیه قرار گرفتند.

هر مخزن مجهز به یک شلنگ هواده منشعب از یک لوله اصلی متصل به دستگاه هواده مرکزی بود. پمپ هواده و سنگ هوا جهت هوادهی مطلوب در حد اشباع در تمام مدت دوره به طور مستمر فعال بود. در طول آزمایش میانگین درجه حرارت آب در آکواریومها ۲۸ درجه سانتی گراد بود. میزان غذادهی ماهیان آنجل در تمامی تیمارها روزانه سه نوبت در ساعات ۹، ۱۴، ۱۹ به میزان ۲۰ عدد آرتمیا بالغ به ازاء هر ماهی در هر وعده غذایی به صورت روزانه مورد تغذیه قرار گرفتند (Dosta *et al*., 2010).

۴.۲. اندازه گیری شاخص های رشد

شاخصهای رشد ماهی آنجل، بر اساس فرمولهای به شرح ذیل تعیین گردید:

۱) افزایش وزن بدن

$$BWI\ (g) = Wt\text{-}Wi$$

۲) نرخ رشد ویژه

$$SGR(\%/day) = \left[\frac{LnWt - LnWi}{T}\right] \times 100$$

۳) شاخص وضعیت

$$CF = \frac{Wt}{L^3} \times 100$$

۴) درصد میزان بقاء[۱]

$$SR\ (\%) = (Nt/Ni) \times 100$$

در معادلات مذکور Wi = وزن اولیه ماهی، Wt = وزن نهایی ماهی، T = طول مدت پرورش، C = مقدار غذای خورده شده روزانه، L = طول نهایی، Nt = تعداد نهایی انگشت قد ماهی و Ni = تعداد اولیه انگشت قد ماهی می‌باشد (Abid *et al*., 2013).

جهت بررسی تعداد باکتریهای اسید لاکتیک و همچنین تعداد کل باکتریهای موجود در میکروبیوتای روده ماهیهای تغذیه شده با پری بیوتیک، پروبیوتیک و سین بیوتیک، در ابتدا و انتهای دوره به صورت

[۱] Survival rate

تصادفی نمونه برداری از ماهیان انجام شد. در ابتدای دوره تعداد ۱۰ قطعه ماهی و در انتهای دوره تعداد سه قطعه ماهی از هر تکرار انتخاب شدند و جهت انجام بررسیهای باکتری شناسی به صورت زنده و در کیسه های پلاستیکی حمل ماهی به آزمایشگاه پاستور تهران منتقل گردیدند.

کشت باکتریها بر اساس روش شرح داده شده توسط Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۴) انجام گردید. بدین ترتیب که پس از انتقال به آزمایشگاه ماهیها با برش نازک در ستون فقرات کشته شده و سپس با آب استریل شستشو داده شدند. جهت از بین بردن کامل باکتریهای موجود در سطح خارجی بدن انگشت قد ماهیها، به مدت ۶۰ ثانیه در محلول نمکی بنزالکونیوم کلراید[1] ۰/۱ درصد شسته شده و پس از آن دوباره با آب استریل شستشو داده شده و سپس آب نمونه ها پس از مدتی گرفته شد. پس از ضدعفونی کردن و شستشو با آب مقطر، نمونه ها با تیغ اسکالپل استریل، کالبدگشایی شده و روده آنها خارج شد. نمونه های روده پس از تخلیه کامل محتویات، توزین و به هاون چینی استریل منتقل گردید. پس از هموژن نمودن نمونه های روده با استفاده از محلول نمکی استریل (۰/۸۷ درصد w/v) رقت های 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه گردید. از رقتهای تهیه شده، تحت شرایط کاملا استریل حجمی معادل ۰/۱ میلی متر برداشته شد و به محیط های کشت پلیت کانت آگار (PCA، جهت تعیین تعداد کل باکتریها) و MRS (جهت تعیین تعداد باکتریهای اسیدلاکتیک) منتقل و در سطح پلیت پخش شدند. انکوباسیون پلیتها به مدت سه روز در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در شرایط هوازی صورت پذیرفت. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، شمارش باکتریها انجام شده و بر حسب لگاریتم واحد کلنی (تعداد کلنیهای باکتریایی رشد یافته بر روی محیط کشت × عکس ضریب رقیق سازی) در میلی گرم وزن روده ثبت شد (Rengpipat *et al.*, 1998).

در انتهای دروه آزمایش به منظور بررسی اثرات سین بیوتیک بر مقاومت ماهیها در برابر استرس محیطی، تعداد پنج عدد ماهی از هر تکرار انتخاب شده و به ظروف آزمایش مجهز به هواده منتقل شدند. تحمل شوری ماهیان با قرار دادن در شوریهای یک، دو، شش و ۱۲ گرم در لیتر و شمارش تعداد ماهی مرده تا ۲۴ ساعت پس از استرس تعیین گردید.

جهت تعیین مقاومت ماهیها در برابر استرس کاهش درجه حرارت، تعداد پنج عدد ماهی از هر تکرار انتخاب شده و تلفات ماهیان پس از گذشت ۲۴ ساعت در برابر درجه حرارتهای ۲۰، ۱۹، ۱۸ و ۱۷ درجه سانتی گراد شمارش و بازماندگی آنها محاسبه گردید.

۵.۲. نحوه محاسبات آماری

ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی گردید. برای مقایسه میانگین داده ها بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و جهت تعیین سطح معنی دار بودن از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ($P < ۰/۰۵$) استفاده گردید. برای آنالیز آماری از بسته نرم افزاری SPSS (ویرایش ۲۱) و رسم جداول و نمودارهای مورد نیاز از نرم افزار Excel (ویرایش ۲۰۱۰) استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. شاخصهای رشد

اثرات غنی سازی آرتیما با سین بیوتیک، پروبیوتیک و پری بیوتیک پس از ۴۸ روز تغذیه بر شاخصهای رشد ماهی آنجل در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

[1] Benzalkolium chloride

جدول ۲- مقایسه شاخصهای رشد و بازماندگی در ماهی آنجل پس از ۴۸ روز تغذیه در تیمارهای مختلف

شاخص	شاهد	پری بیوتیک	پروبیوتیک	سین بیوتیک
میانگین وزن ابتدای دوره (گرم)	۳/۲۰ ± ۰/۱۳^{a}	۳/۲۱ ± ۰/۱۸^{a}	۳/۱۸ ± ۰/۳۱^{a}	۳/۲۲ ± ۰/۲۳^{a}
میانگین طول ابتدای دوره (سانتی متر)	۳/۶۱ ± ۰/۲۰^{a}	۳/۷۴ ± ۰/۳۱^{a}	۳/۶۶ ± ۰/۳۶^{a}	۳/۶۴ ± ۰/۲۱^{a}
میانگین وزن انتهای دوره (گرم)	۷/۲۶ ± ۰/۲۴^{a}	۸/۸۲ ± ۰/۱۱^{b}	۸/۶۳ ± ۰/۲۶^{b}	۹/۹۷ ± ۰/۳۸^{c}
میانگین طول انتهای دوره (سانتی متر)	۵/۱۱ ± ۰/۲۶^{a}	۵/۲۵ ± ۰/۲۴^{a}	۵/۱۸ ± ۰/۳۱^{a}	۵/۵۱ ± ۰/۲۸^{a}
افزایش وزن بدن (گرم)	۴/۰۷ ± ۰/۲۲^{a}	۵/۶۰ ± ۰/۱۰^{b}	۵/۴۵ ± ۰/۲۴^{b}	۶/۷۵ ± ۰/۳۶^{c}
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۶۹ ± ۰/۱۸^{a}	۲/۱۰ ± ۰/۰۶^{b}	۲/۰۵ ± ۰/۱۹^{b}	۲/۳۶ ± ۰/۲۵^{b}
شاخص وضعیت	۵/۴۵ ± ۰/۲۳^{a}	۶/۰۹ ± ۰/۱۱^{a}	۶/۲۱ ± ۰/۲۱^{a}	۵/۹۶ ± ۰/۳۴^{a}
بازماندگی (درصد)	۹۶/۶۷ ± ۱/۷۳^{a}	۹۴/۴۴ ± ۲/۶۵^{a}	۹۴/۴۴ ± ۱/۰۰^{a}	۹۵/۵۶ ±۲/۶۵^{a}

اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف انگلیسی متفاوت دارای اختلاف معنی داری هستند (P <۰/۰۵)

سین بیوتیک: ترکیبی از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید

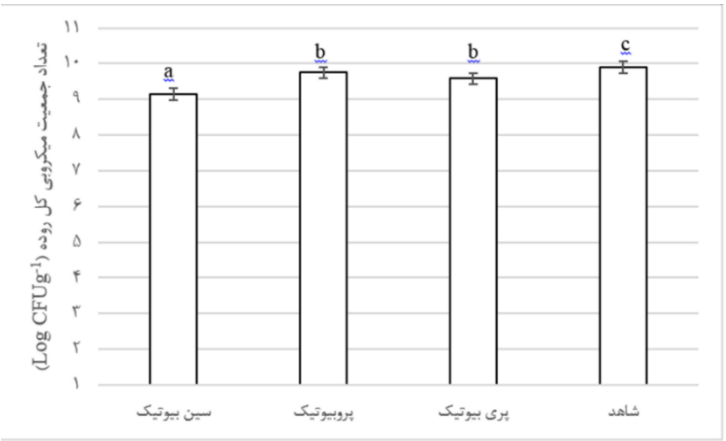
پروبیوتیک: *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک: فروکتوالیگوساکارید

نتایج این مطالعه نشان داد که غنی سازی آرتمیای بالغ با سین بیوتیک تاثیر معنی داری بر شاخصهای رشد ماهی آنجل دارد (P <۰/۰۵). ماهیان تغذیه شده با تیمار سین بیوتیک در وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه نسبت به تیمارهای دیگر از نتایج بهتری برخوردار بود.

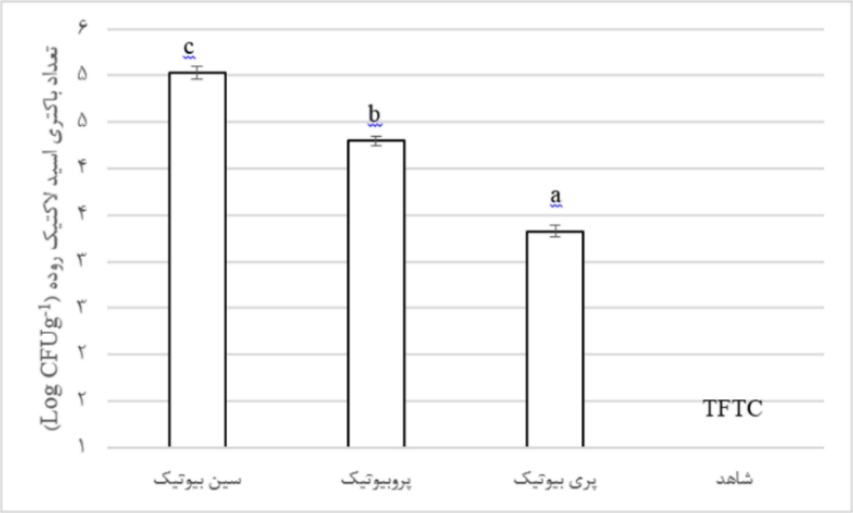
بالاترین میانگین وزن انتهای دوره مربوط به تیمار سین بیوتیک بود که اختلاف معنی داری با تیمارهای پروبیوتیک، پری بیوتیک و شاهد داشت (P <۰/۰۵). بالاترین میانگین طول بدن در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد ولی اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نداشت (P >۰/۰۵). میزان بازماندگی ماهیان در طی دوره ۴۸ روز پرورش بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری نشان نداد (P >۰/۰۵).

۲.۳. جمعیت میکروبی روده

اثر تیمارهای مختلف غنی سازی بر جمعیت میکروبی کل و باکتریهای اسیدلاکتیکی موجود در روده ماهی آنجل در شکلهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج مربوط به شمارش تعداد کل باکتریهای موجود در روده در انتهای دوره آزمایشی نشان دهنده این است که بیشترین میزان کل باکتری موجود در روده مربوط به تیمار شاهد است و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها دارد (P <۰/۰۵). کمترین تعداد کل باکتریهای موجود در روده ماهی در انتهای دوره مربوط به تیمار سین بیوتیک بود که با تیمارهای پروبیوتیک و پری بیوتیک اختلاف معنی داری داشت (شکل ۱).



شکل ۱- تعداد جمعیت میکروبی کل روده ماهی آنجل در تیمارهای مختلف، ستونهای نشانه گذاری شده با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند (P <۰/۰۵). سین بیوتیک: ترکیبی از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید. پروبیوتیک: *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک: فروکتوالیگوساکارید. TFTC: تعداد باکتری کمتر از ۲۰ CFU در هر گرم مشاهده گردید.

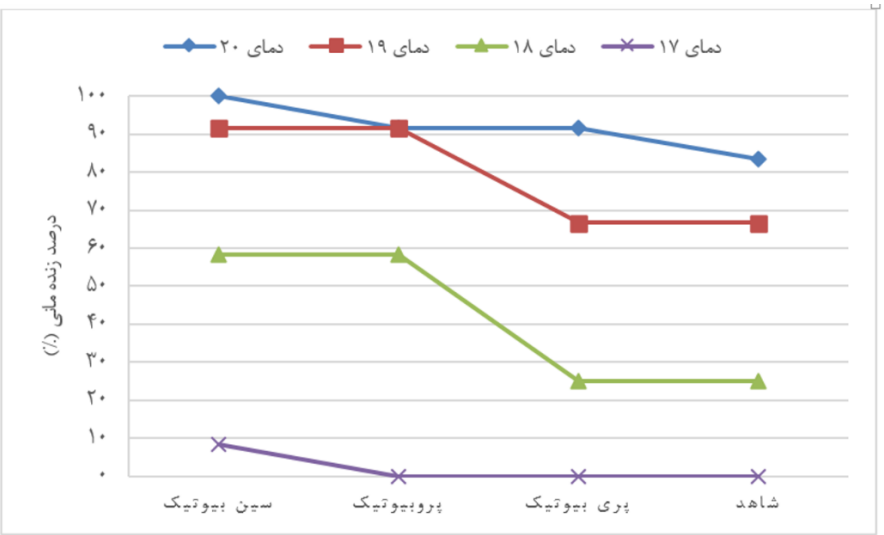


شکل ۲- تعداد باکتری اسید لاکتیک موجود در روده ماهی آنجل در تیمارهای مختلف، ستونهای نشانه گذاری شده با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی داری هستند (P <۰/۰۵). سین بیوتیک: ترکیبی از پروبیوتیک Pediococcus acidilactici و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید. پروبیوتیک: Pediococcus acidilactici و پری بیوتیک: فروکتوالیگوساکارید.

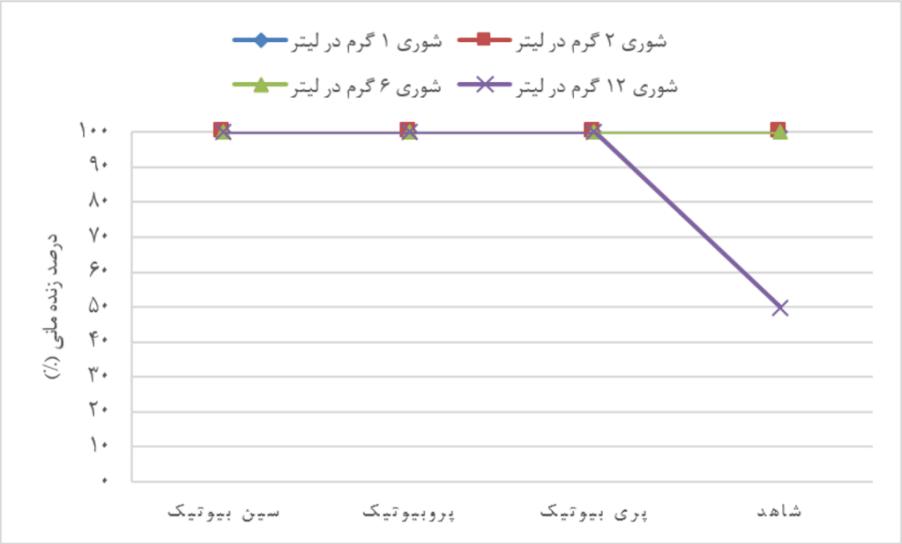
در پایان دوره آزمایش تعداد باکتریهای اسید لاکتیک موجود در روده ماهی آنجل در تیمارهای مختلف نشان داد که تغذیه با آرتمیای غنی شده با سین بیوتیک اثرات قابل توجهی بر تعداد این باکتریها دارد (شکل ۲). نتایج این مطالعه نشان داد اختلاف معنی داری بین تعداد باکتری لاسید لاکتیکی الحاق شده در روده ماهی بین تیمار سین بیوتیک با سایر تیمارها وجود دارد (P <۰/۰۵). بالاترین تعداد باکتری الحاق شده به روده ماهی مربوط به تیمار سین بیوتیک بود. نتایج شمارش باکتریهای اسید لاکتیکی در تیمار شاهد نشان داد که غلظت باکتریهای اسیدلاکتیکی در این تیمار در سطحی کمتر از ۲۰ CFU/g قرار داشت. این در حالیست که ماهیهای تغذیه شده با پروبیوتیک میزان باکتریهای اسیدلاکتیک بیشتری را نسبت به تیمار پری بیوتیک داشت و این تیمارها اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشتند (P <۰/۰۵).

۳.۳. مقاومت در برابر استرسهای محیطی

مقاومت ماهی آنجل در برابر شرایط استرس محیطی (کاهش درجه حرارت و افزایش شوری) در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. غنی سازی آرتمیا با سین بیوتیک نقش موثری در افزایش مقاومت ماهیها در برابر شرایط استرسی داشت. به طوری که ماهیان تغذیه شده با آرتمیای حاوی سین بیوتیک به طور معنی داری در برابر این شرایط نسبت به گروه شاهد مقاومت بیشتری داشتند (P <۰/۰۵). بیشترین مقاومت در برابر دمای ۱۷ درجه سانتی گراد در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد (شکل ۳). نتایج این مطالعه نشان داد که ماهیان تغذیه شده با آرتمیای حاوی سین بیوتیک مقاومت بیشتری در برابر شوری ۱۲ گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد داشتند (P <۰/۰۵). این در حالیست که بین تیمار شاهد و تیمارهای پروبیوتیک و پری بیوتیک اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (شکل ۴).



شکل ۳- درصد زنده مانی ماهی آنجل در تیمارهای مختلف پس از مواجهه ۲۴ ساعت با استرس کاهش درجه حرارت. سین بیوتیک: ترکیبی از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید. پروبیوتیک: *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک: فروکتوالیگوساکارید.



شکل ۴- درصد زنده مانی ماهی آنجل در تیمارهای مختلف پس از مواجهه ۲۴ ساعت با استرس افزایش شوری. سین بیوتیک: ترکیبی از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید. پروبیوتیک: *Pediococcus acidilactici* و پری بیوتیک: فروکتوالیگوساکارید.

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که غنی سازی آرتمیای بالغ با سین بیوتیک ترکیبی از پروبیوتیک *P. acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید به صورت معنی داری باعث بهبود شرایط رشد از جمله وزن نهایی و میزان نرخ رشد

ویژه ماهی آنجل گردید. این نتایج با یافته ها و گزارشهای ارائه شده در مطالعات دیگر در خصوص استفاده از سین بیوتیکها در جیره غذایی انواع آبزیان نیز همخوانی دارد (Ghosh *et al*., 2007; Daniels *et al*., 2013; Hoseinifar *et al*., 2015). این امر می تواند به دلیل نقش ترکیبات پروبیوتیکی و پری بیوتیکی در اصلاح فلور میکروبی روده باشد (Mahious *et al*., 2006). زیرا اثبات شده که باکتریهای مفید دستگاه گوارش با تولید آنزیمها و مواد متابولیکی باعث تسهیل هضم و جذب غذا و افزایش ارزش غذایی آن و کاهش مصرف انرژی می گردند (Daniels *et al*., 2013). ترکیبات پری بیوتیکی از طریق تغییر توزان جمعیت میکروبی روده به سمت باکتریهای بالقوه مفید سبب بهبود وضعیت سلامت و ایمنی میزبان می شوند (Gibson *et al*., 2004).

نشان داده شده است که سویه باکتری *P. acidilactici* به عنوان پروبیوتیک در ماهی قزل آلای رنگین کمان می تواند باعث کاهش ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه بیشتر شود و میزان بقاء در گروه تغذیه شده با این پروبیوتیک بیشتر از سایر تیمارها باشد (Aubin *et al*., 2005). Merrifield و همکاران در سال ۲۰۱۰ به این نتیجه رسیدند که استفاده از پروبیوتیک در جیره ماهی قزل آلا در کاهش ضریب تبدیل غذایی، تعادل میکروبی روده و سلامتی و بازماندگی آنها موثر است. Daniels در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی اثرات غنی سازی آرتمیا را در سطوح مختلف ۲۰،۲ و ۲۰۰ قسمت در هزار مانان الیگوساکارید را در لابستر اروپایی (*Homarus gammarus*) مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند با افزودن مانان الیگوساکارید در سطوح ۲ و ۲۰ قسمت در هزار میزان بازماندگی و رشد افزایش می یابد. Hoseinifar و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشاهده کردند که استفاده از پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید در جیره غذایی فیل ماهی منجر به افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش بقا، می شود. همچنین در یک مطالعه دیگری استفاده همزمان پروبیوتیک باسیلوس TC_{22} به میزان 1×9^{10} CFU/Kg و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید به میزان ۰/۰۵ درصد جیره غذایی در ماهی *Aspostichopus japonicas* باعث شد تا ضریب رشد ویژه دارای تفاوت معنی داری ($P<0/05$) با گروه شاهد باشد (Yancui *et al*., 2011). در مطالعه دیگری استفاده سویه باکتری *P. acidilactici* به صورت مجزا و به عنوان مکمل پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی آنجل نتایج معنی داری در شاخصهای رشد این ماهی مشاهده نگردید (Yigit *et al*., 2014).

افزایش رشد مشاهده شده در مطالعه حاضر در تیمار سین بیوتیک را می توان به بهبود وضعیت فیزیولوژیک روده ماهی آنجل در نتیجه تخمیر پروبیوتیک و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه نسبت داد. با توجه به اینکه اسیدهای چرب به عنوان منبع انرژی برای پرزهای روده مطرح هستند، افزایش میزان آنها در روده سبب افزایش رشد پرزهای روده می شود (Cherbut *et al*., 1997). این افزایش رشد، افزایش جذب و بهبود کارایی مصرف جیره را به دنبال داشته و سبب افزایش رشد ماهی می شود. به علاوه اسیدهای چرب زنجیره کوتاه متابولیسم چربیها را بهبود بخشیده و استفاده بهتر از جیره را سبب می شود (Hoseinifar *et al*., 2015).

جمعیت میکروبی روده ماهی شامل مجموعه پیچیده ای از انواع باکتریهای هوازی، بی هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری می باشد (Cahil, 1990). تشکیل فلور باکتریایی پس از شروع تغذیه فعال آغاز می شود. فلور میکروبی روده از باکتریهای بومی[1]، موقت و گذرا[2] تشکیل شده است (Ringø and Birkbeck, 1999). محققین اظهار نموده بودند هرچند دستگاه گوارش ماهی اکوسیستمی متفاوت از آب محیط پرورش دارد اما روده ماهیها فلور ثابت و پایداری ندارد، با این حال در مطالعات انجام شده بر میکروبیوتای دستگاه گوارش و بخصوص روده شباهتی بین جوامع باکتریایی جدا شده از آب، غذا و روده وجود نداشته است (Cahil, 1990). اگرچه حضور باکتریهای اسیدلاکتیک در روده بسیاری از ماهیان از جمله ماهی کاد اقیانوس اطلس، ماهی آزاد اقیانوس

[1] Indigenous

[2] Transit

اطلس، قزل آلای رنگین کمان، فیل ماهی، قره برون و چار قطبی ثابت شده است، اما این باکتریها جزو فلور غالب روده نیستند (Ringø and Gatesoupe, 1998; Askarian *et al*., 2009). تلاش جهت افزایش تعداد و غالبیت باکتریهای اسید لاکتیک از طریق به کار گیری سویه های پروبیوتیکی عمدتاً منتج به تشکیل کلنی پایدار در میکروبیوتای روده ای ماهیان نشده است (Rurangwa *et al*., 2009). دست یافتن به این مهم مستلزم استفاده از پری بیوتیک به عنوان سوبسترا به عنوان یک ترکیب سین بیوتیکی است (Hoseinifar *et al*., 2011).

چنانکه از نتایج این آزمایش بر می آید، باکتری پروبیوتیکی توانسته با درصد قابل قبولی به خوبی فلور غالب باکتریایی روده ماهی را تشکیل دهند که این امر در تیمار سین بیوتیک با درصد مناسبی کاملاً مشهود است. در واقع شرط لازم برای این که پروبیوتیکی بتواند تاثیرات خود را اعمال کند، همین استقرار در دستگاه گوارش است. بیشترین تعداد باکتری اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده ای ماهی تغذیه شده با سین بیوتیک مشاهده گردید. تفاوت معنی داری بین تیمارهای پروبیوتیک و پری بیوتیک از نظر تعداد باکتری اسید لاکتیک وجود داشت و تعداد آنها در ماهیهای تغذیه شده با پروبیوتیک بیشتر بود. Daniel و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثرات سین بیوتیکی *Bacillus* spp. و مانان الیگوساکارید بر میکروبیوتای روده ای لارو لابستر اروپایی (*Homarus gammarus*) پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد با به کارگیری سین بیوتیک کلنی موفقیت آمیز *Bacillus* spp. در روده صورت گرفته است. نتایج مشابهی در مطالعه انجام شده توسط Abid و همکاران (۲۰۱۳) بر ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) مشاهده گردید. در این مطالعه آزاد ماهی اقیانوس اطلس با جیره غذایی حاوی سین بیوتیک ترکیبی از پروبیوتیک *P. acidilactici* و پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید به مدت ۶۳ روز تغذیه شدند. جمعیت میکروبی باکتری اسید لاکتیک در روده ماهی بیش از 10^6 CFU/g روده ماهی مشاهده گردید. همچنین تیمار میگوی پاسفید غربی با ترکسیب سین بیوتیک *Bacillus* و ایزومالتوالیگوساکارید به مدت ۲۸ روز سبب افزایش تعداد کل باکتریها و کاهش تعداد *Vibrio* spp. در میکروبیوتای روده گردید (Li *et al*., 2009).

نتایج مطالعات فوق مشابه نتایج مطالعه حاضر بوده و موید افزایش باکتریهای اسید لاکتیک در روده ماهی آنجل می باشد. افزایش تعداد باکتریهای اسید لاکتیک به دلیل تامین سوبسترای لازم جهت رشد در تیمار سین بیوتیکی است. این افزایش تعداد در میکروبیوتای روده ای موجب کاهش تعداد باکتریهای بیماری زا و غیر مفید می شود که نهایتاً غالبیت پایدار باکتریهای مفید را در جمعیت میکروبی روده ای به دنبال دارد (Cerezuela *et al*., 2011).

در مطالعه حاضر تست مواجهه ماهی آنجل با استرس محیطی (شوری و درجه حرارت) پس از ۴۸ روز تغذیه با آرتمیا غنی شده با سین بیوتیک نتایج جالب توجهی نشان داد. بیشترین میزان بقاء در استرس سرمای ۱۷ درجه سانتی گراد پس از ۲۴ ساعت مواجهه (۸/۳۳ درصد) در ماهیهای تغذیه شده با آرتمیای حاوی سین بیوتیک بود. با این حال در درجه حرارتهای ۱۸ و ۱۹ درجه سانتی گراد تیمار سین بیوتیک و پروبیوتیک بیشترین میزان بقاء ماهی در برابر استرس درجه حرارت را از خود نشان دادند. در این مطالعه استفاده از ترکیب سین بیوتیک توان مقاومت ماهی آنجل را در برابر تنش با شوری ۱۲ گرم بر لیتر بالا برد و بیانگر بازماندگی ۱۰۰ درصد ماهیان تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با سین بیوتیک بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشت ($P < ۰/۰۵$).

مقاومت در برابر استرسهای محیطی (شوری) تحت تاثیر عواملی مانند میزان شوری، عوامل محیطی، گونه ماهی، دستکاری، اندازه، سن ماهی و مراحل مختلف زیستی و شرایط تغذیه ای قرار دارد (Clarke, 1982). در مطالعه صورت گرفته توسط Dimitroglou و همکاران (۲۰۱۰) اضافه کردن پری بیوتیک مانان الیگوساکارید در جیره غذایی لارو ماهی شانک (*Diplodus sargus*) به مدت ۴۳ روز باعث افزایش مقاومت لارو در برابر استرس شوری ۶۰ میلی گرم در لیتر گردید. Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک فروکتوالیگوساکارید به جیره بچه ماهیان کلمه در سطح ۳٪ منجر به افزایش معنی داری در میزان

مقاومت در برابر تنش شوری (۱۵۰ گرم در لیتر) پس از گذشت ۷۲ ساعت در مقایسه با تیمار شاهد گردید. مطالعه دیگر صورت گرفته بر روی لارو ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) نشان داد که غنی سازی ناپلی آرتمیا و روتیفر به مدت ۲۴ ساعت در سطح ۰/۲ درصد مانان الیگوساکارید، منجر به افزایش مقاومت در برابر استرس شوری در مقایسه با گروه شاهد گردید (Salze *et al*., 2008).

افزایش بازماندگی و مقاومت ماهی در مواجهه با استرسهای محیطی در مطالعه حاضر موید افزایش ایمنی ماهیها می باشد. نظر به اینکه استفاده از سین بیوتیکها در جیره غذایی ماهیان جهت افزایش ایمنی و پیشگیری و یا افزایش مقاومت ماهی در برابر عوامل استرس زا است، لذا این ترکیب می تواند به عنوان راهکاری مناسب و عملی جهت پرورش ماهیان زینتی مطرح باشد.

۵. تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مدیریت و پرسنل کارگاه ماهیان زینتی شریفیان واقع در استان تهران، شهرری به دلیل همکاری و مهیا نمودن امکانات و شرایط لازم ابراز می دارد.

References

Abid, A., Davies, S.J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., Carnevali, O., Brickerdike, R., Romero, J., Merrifield, D.L., 2013. Dietary symbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6),1948-1956.

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.

Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbé, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 36,758-767.

Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: A Review. *Microbial Ecology*, 19, 21-41.

Cerezuela, R., Meseguer, J., Esteban, M., 2011. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 1, 1-7.

Cherbut, C., Aube, A., Blottiere, H., Galmiche, J., 1997. Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. Scandinavian journal of gastroenterology Supplement 222,58.

Clarke, W., 1982. Evaluation of the seawater challenge test as an index of marine survival. *Aquaculture*, 28, 177-183.

Daniels, C.L., 2006. Bio-Mos® improves the growth and survival of cultured European Lobster. *Fish Farm*, 29, 24-27.

Daniels, C.L., Merrifield, D.L., Boothroyd, D.P., Davies, S.J., Factor, J.R., Arnold, K.E., 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304, 49-57.

Daniels, C.L., Merrifield, D.L., Ringo, E., Davies, S.J., 2013. Probiotic, prebiotic, synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. *Aquaculture*, 416, 396-406.

Dimitroglou, A., Merrifeld, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. E¡ects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300, 182 - 188.

Dosta, M.C.M., Barrera, T.C., Perrino, F.J.F., Reyes, L.M., 2010. Inhibition of *Aeromonas hydrophila* by probiotic strains isolated from the digestive tract of *Pterophyllum scalare*. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 9(1), 37-42.

Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals, *Journal Applied Bacteriology*, 66, 365-366.

Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio, *Aquatic Living Resource*, 7, 277–282.

Gatesoupe, F.J., Ronald Ross, W., Victor, R.P., 2010. Probiotics and other microbial Manipulations in Fish Feeds: Prospective Health Benefits. Bioactive Foods in Promoting Health, Boston, Academic Press, pp. 541-552.

Ghaderpour, S., Agh, N., Noori, F., Ahmadian, E., 2013. Introducing standard protocol for enrichment of *Artemia franciscana* Nauplii with canola oil. *Iranian Aquaculture Society Journal*, 1(2), 27-40. (In Persian)

Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female live bearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.

Gibson G.R., 2004. Fiber and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition*

Supplements, 1, 25-31.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Rostami, H.K., Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 17,498-504.

Hoseinifar, S.H., Sharifian, M., Vesaghi, M.J., Khalili, M., Esteban, M.A.2014 The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 39,231-236.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Sharifian, M., Esteban, M.A., 2015. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhyncchus mykiss*) upon symbiotic feeding. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 27-32.

Kruger, D.P., Britz, P.J., Sales, J., 2001. The influence of live feed supplementation on growth and reproductive performance of swordtail (*Xiphophorus helleri* H.) broodstock. *Aquarium Science Conseption*, 3, 265-273.

Li, J., Tan, B., Mai, K., 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291, 35-40.

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

Merrifield, D., Bardley, G., Baker, R., Davies, S., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related heath criteria post antibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16, 496-503.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1-18.

Peter, H., Sneath, A., 1986. Bergeys manual of systematic, *Bacteriology*, 2, 1104-1154.

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

Ringø, E., Birkbeck, T., 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30, 73.

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

Ringø, E., Sinclair, P.D., Birkbeck, H., Barbour, A., 1992. Production of eicosapentaenoic acid 20:5 n-3 by *Vibrio pelagius* isolated from turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae. *Applied Environment Microbiology*, 58, 3777–3778.

Rurangwa, E., Laranja, J.L., Van Houdt, R., Delaedt, Y., Geraylou, Z., Van de Wiele, T., 2009. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono cultures in vitro. *Journal of applied Microbiology*, 106, 932-940.

Sales, J., Janssens, G.P.J., 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resource*, 16, 533-540.

Salze, G., Mclean, E., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*, 174 (6), 148-152.

Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, S.H., Barati, M., Hasan Abadi, Z., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccarid (FOS) improve the innate immune respons stress resistance digestive enzyme activitives and growth performace of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shelfish Immunology*, 32, 316-321.

Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007. Anti-infectious potential of beta mercapto ethanol treated baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge test. *Journal Applied Microbiology*, 104, 1137–1146.

Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200,147-159.

Teresita, D.N.J., Maldonado-Montiel, J., Leticia, G., 2005. Rodríguez-Canché 185 Biomass production and nutritional value of *Artemia* spp. (Anostraca: Artemiidae) in Campeche. *Mexico Revista de Biological Tropical*, 53(3-4), 447–454.

Yancui, Z., Kangsen, M., Wei, X., Wenbing, Z., 2011. Influence of dietary probiotic *Bacillus* TC22 and prebiotic fructooligosaccharide on growth, immune responses and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in sea cucumber *Apostichopus japonicas*. *Journal Ocean University of China*, 3, 293-300.

Yigit, N. O., Koca, S.B., Dulluce, A., Didinen, B.I., Diler, I., 2014. Effect of *Pediococcus acidilactici* supplementation in diet on growth and survival rate of angel fish (*Pterophyllum scalare* L.). *Ericiyes Universitesi Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi*, 30(1), 1-3.