شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
صفحات ۶۱۸-۶۰۷

تأثیر باکتری‌های جدا شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت قد بر ترکیبات بیوشیمیایی عصاره بدن، ترشح نیتروژن متابولیکی و مدت زمان زنده مانی لاروهای کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجه با استرس‌های محیطی

محسن پور عباسعلی[1*]، حجت‌الله جعفریان[2]، شایان قبادی[1]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، بابل، مازندران
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، گلستان

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

چکیده

در یک آزمایش تغذیه‌ای، *Bacillus subtilis*، *Bacillus lichenifirmis* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* جدا شده از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*)، به صورت مخلوط سوسپانسیونی، در سه غلظت $1/5\times10^{6}$ و 3×10^{6} و $4/5\times10^{6}$ CFU/g با جیره‌های آزمایشی مکمل سازی و توسط لارو ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به مدت ۴۵ روز مورد استفاده قرار گرفتند. در انتهای دوره غذادهی، لاروها در مواجه با استرس‌های محیطی مختلف شامل: آمونیاک بالا (۵ mg/L)، دمای بالا (۴۰ C^{o})، پی-اچ پایین (pH=۲) و پی-اچ بالا (pH=۱۲) قرار گرفتند. شاخص‌های بیوشیمیایی نیز پس از استخراج عصاره بدن لاروها بر اساس روش‌های معمول آزمایشگاهی سنجش شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد به‌طور معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<0/05$). بالاترین مدت زمان زنده مانی لاروها در مقابله با تنش‌های محیطی در تیمار T3 ثبت شد($p<0/05$). بالاترین میزان یونهای سدیم و پتاسیم در تیمار T3 اندازه‌گیری شد ($p<0/05$). بالاترین میزان گلوکز در تیمار T2 اندازه‌گیری شد($p<0/05$). میزان کورتیزول در تیمار T3 به شکل معنی داری پایین تر از سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد اندازه‌گیری شد ($p<0/05$). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر جدا شده از دستگاه گوارش فیل‌ماهیان انگشت قد بخصوص در سطح $4/5\times10^{6}$ CFU/g تاثیرات مثبت و معنی داری در ارتقاء شاخص‌های رشد، ترکیبات شیمیایی عصاره بدن و مدت زمان زنده مانی توسط لاروهای کپور معمولی در برابر تنش‌های محیطی داشت.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، باسیلوس، مخمر، عصاره بدن، ترشح آمونیاک

* نویسنده مسئول: محسن پور عباسعلی
Email: mpourabasali@gmail.com

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 4, Winter 2020
pp. 607-618

The effect of isolated bacteria from the intestinal duct of Beluga (*Huso huso*) fingerling on biochemical compounds of body extract, excretion of metabolic nitrogen and survival of Common Carp (*Cyprinus carpio*) larvae against environmental stresses

Mohsen Pour Abasali[1*], Hojatollah Jafaryan[2], Shayan Ghobadi[1]

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Babol, Mazandaran,Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Gonbad-e Kavous university, Gonbad-e Kavous, Golestan, Iran

Received: 18-Oct-2020 **Accepted: 27-Dec-2020**

Abstract

In a nutritional experiment, *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichenifirmis* and yeast of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from the intestine of Beluga (*Huso huso*) in suspended blend at three different concentrations (1.5×10^6, 3×10^6 and 4.5×10^6 CFU/g) and added to basal diet and considered as experimental treatments. The common carp (*Cyprinus carpio*) larvae were fed the experimental diet for a period of 45 days. At the end of the feeding period, larvae were exposed to various environmental stresses challenges containing: high level of ammonia (5 mg/L), high thermal pressure (40C°), low Acid (pH=2) and high Alkaline (pH=12) conditions. Furthermore, Biochemical parameters were measured after preparing the larval body extract through the routine method. The results showed that growth indices increased significantly in experimental treatments compared to control group ($p < 0.05$). The highest survival rate of larvae was recorded in T3 treatment against environmental stresses ($p<0.05$). The highest Na^+ and K^+ ions in larval body extract was measured in T3 treatment ($p < 0.05$). The highest glucose level was measured in T2 treatment ($p < 0.05$). Cortisol level in T3 treatment was significantly lower than other experimental treatments ($p < 0.05$). The results of this study indicated that the simultaneous use of *Bacillus* and yeast probiotics in diet of common carp larvae, isolated from the gastrointestinal tract of Beluga, had positive and significant effects on improving the growth parameters, biochemical compounds of body extract, survival rate and resistance against environmental stresses, especially, at the level of 4.5 10 106 CFU/g.

Keywords: Common Carp, Bacillus, yeast, body extract, ammonia excretion

Corresponding author: Mohsen Pour Abasali Email: mpourabasali@gmail.com

۱. مقدمه

در طول یک دهه گذشته پرورش آبزیان یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های بشر در تولید غذا برای جوامع انسانی بوده است (FAO, 2012). یکی از راه‌های افزایش تولید آبزیان در واحد سطح، افزایش تراکم است که در برخی موارد منجر به شیوع بیماری‌های متعدد و درنتیجه بروز تلفات عظیم و خسارات اقتصادی قابل توجه گردیده است (Verma and Gupta, 2015). افزایش تراکم و تجاری‌سازی تولیدات در صنعت آبزی‌پروری چالش‌های زیادی ازجمله بروز عوامل بیماری‌زا بخصوص عفونت‌های باکتریایی را به همراه داشته است که به‌عنوان یکی از محدودیت‌های اساسی در گسترش این صنعت شناخته می‌شود و علاوه بر عفونت‌های باکتریایی، کیفیت غذا نیز باعث بروز مرگ و میر در مزارع می‌گردد (Munirasu *et al*., 2017)؛ بنابراین نیاز به بررسی کیفیت خوراک و روش‌های غذادهی به‌منظور بهبود عملکرد رشد و کارایی تغذیه حیوانات پرورشی احساس می‌گردد. گزارشات مختلفی حاکی از آن است که مکمل‌های پروبیوتیکی با تقویت سیستم ایمنی می‌توانند شیوع بیماری را کاهش دهند و با بهبود پارامترهای رشد و کارایی تغذیه باعث کاهش هزینه‌های پرورش ماهی و میگو شوند (Munirasu *et al*., 2017).

در همین ارتباط Prasad و همکاران (۲۰۰۳) گزارش دادند که سویه *Lactic Acid Bacteria* به شکل رایج می‌تواند در کنترل پاتوژن‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، انواع دیگر ارگانیزم‌های پروبیوتیکی مانند گونه‌های مختلف *Bacillus*ها جهت کاهش ترشح مواد دفعی متابولیک در سیستم‌های آبی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kamei *et al*., 1988). این ارگانیزم‌ها ممکن است به شکل منفرد و یا ترکیبی استفاده شوند. به‌عنوان‌مثال استفاده از *Lactobacillus rhamnosus* و *L. sporogenes* به شکلی مجزا و ترکیبی باعث بهبود سلامتی و فزایش مقاومت ماهیان کپور معمولی در مواجه با عوامل بیماری‌زا شد (Allameh *et al*., 2016; Chi *et al*., 2014; Faramarzi *et al*., 2011; Harikrishnan *et al*., 2010).

وجود برخی از ترکیبات نیتروژندار آلوده‌کننده از قبیل آمونیاک، نیترات و نیتریت به‌عنوان یک مشکل جدی در آبزی‌پروری شناخته می‌شوند. افزایش غلظت این ترکیبات در محیط‌زیست ممکن است به شکل وحشتناکی مضر و باعث شیوع مرگ‌ومیر گسترده شود (Michael *et al*., 2015). در این رابطه Ma و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند استفاده از *Lactobacillus* علاوه بر حذف عوامل آلاینده نیتروژندار باعث نابودی عوامل بیماری‌زا از مزارع پرورش میگو نیز شد. بر اساس گزارش Stanier و همکاران (۱۹۶۳) باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در تبدیل مواد آلی به Co2 مؤثر هستند. بر اساس با تحقیقات انجام‌شده باکتری‌های گرم مثبت و بی هوازی مانند انواع *Basillus*ها در توسعه کیفیت آب، کاهش آلودگی‌های عوامل بیماری‌زا، بالا بردن نرخ بقاء و عملکرد رشد و بهتر شدن موقعیت سلامت لاروهای نوجوان میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) نیز مؤثر هستند (Dalmin *et al*., 2001; Ngan *et al*., 2011). تحقیقات صورت گرفته نشان داد به‌کارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیکی قابلیت افزایش رشد در آبزیان پرورشی را داشته و می‌توانند علاوه بر آن در میزان ترشح ترکیبات متابولیکی مثل آمونیاک و اوره ایفای نقش کنند (Faramarzi, 2011). همچنین تحقیقات مختلف نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک‌های بومی در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری می‌تواند قابلیت بالاتری در افزایش عملکرد رشد آبزیان داشته باشد و ضمن همسویی با محیط‌زیست در کاهش استفاده از پروبیوتیک‌های تجاری خارجی و کاهش خروج ارز از کشور مفید بوده و به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد (Jafaryan *et al*., 2011). در این راستا، این میکروارگانیزم‌ها به‌صورت اسپور خالص تهیه و در محیط کشت به باکتری‌های رویشی تبدیل شدند. سپس در جیره غذایی لارو کپور مورد استفاده قرار گرفتند. بنابراین، برخلاف سایر محصولات تجاری از هرگونه ترکیبات افزودنی که ممکن است باعث

تأثیرگذاری روی رشد و اختلال در روند آزمایش گردند، جلوگیری شد. با توجه به اینکه این ترکیبات قابلیت ماندگاری و کلونی شدن در دستگاه گوارش ماهیان پرورشی را دارند و در ساخت غذا و حین حرارت دهی از قابلیت ماندگاری و مقاومت بالایی برخوردارند.

تحقیق حاضر با هدف به‌کارگیری *Bacillus subtilis*، *Bacillus lichenifirmis* و *Saccharomyces cerevisiae* به‌عنوان میکروارگانیزم‌های پروبیوتیکی بومی جداسازی شده از روده بچه فیل‌ماهیان انگشت قد (*Huso huso*)، در جیره غذایی مرحله لاروی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به کار رفت و تأثیر آن‌ها بر شاخص‌های رشد، برخی ترکیبات بیوشیمیایی عصاره بدن، ترشح آمونیاک و اوره، انرژی اتلافی از طریق این ترکیبات متابولیکی و زنده مانی لاروها در برابر استرس‌های مختلف محیطی ارزیابی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. طرح آزمایش

تحقیق حاضر در یک دوره ۴۵ روزه در آزمایشگاه تغذیه آبزیان دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. در ابتدای آزمایش و به‌منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی تعداد ۳۶۰ قطعه لارو ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی (±SD) ۰±۲۰۰/۱۰ میلی‌گرم از کارگاه پرورش ماهیان گرمآبی شهید چمران (گلستان، ایران) تهیه شد. لاروها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه به مدت یک هفته با شرایط جدید سازگار شدند. پس یک هفته لاروها به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن پلاستیکی با حجم آبگیری ۶ لیتر با شرایط یکسان از نظر حجم آب و فاکتورهای کمی و کیفی مشابه توزیع شدند. تراکم لاروها در هر مخزن ۳۰ عدد بود.

میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمی آب در طی دوره پرورش شامل: دما (°C ۱/۳۵±۲۴/۵)، اکسیژن محلول (mg/L ۰/۶۵±۷/۵)، pH (۰/۱۸ ±۷/۶)، شوری (mg/L ۳۲/۴۱ ±۵۲۵)، نیتریت (mg/L ۰/۰۱۳ ±۰/۰۰۱) و مقدار جامدات محلول (mg/L ۵۰/۲۵±۵۶۸/۵۶) بود.

۲.۲. تهیه و آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی

Bacillus subtilis (BL-HH)، *Bacillus lichenifirmis* (BS-HH) و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* (شناسایی شده در حد جنس و گونه) که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. این میکروارگانیزم‌ها توسط دهقان (۱۳۹۰) از روده فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت قد جداسازی و بر اساس توالی یابی ژنی شناسایی گردیدند و طی تحقیقات مختلف ثابت که دارای خاصیت پروبیوتیکی می‌باشند (Dehghan *et al*., 2009; Hassanpour fatahi, 2013; Abdollahi-Arpanahi *et al*., 2018; Abdollahi Arpanahi, 2019). در این بررسی از شکل لیوفیلیزه این میکروارگانیزم‌ها استفاده شد. ابتدا محصول لیوفیلیزه باسیلوس‌ها پس از مخلوط سازی با سرم فیزیولوژی نمک استریل (۰/۸۷ v/w Nacl درصد) روی پلیت‌های کشت حاوی محیط کشت باکتری TSA و در خصوص مخمر روی محیط کشت سابرودکستروز آگار (SDA) کشت داده شد. پس طی دوره انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°Cدرجه سانتی گراد، پرگنه‌های باسیلوس و مخمر در پلیت‌های کشت ظاهر شد (Rengpipat *et al*., 1998). بخشی از پرگنه‌های هر یک از باسیلوس‌ها و مخمر بطور جداگانه با استفاده از آنس استریل برداشته شد و درون فالکون‌های اپندروف حاوی ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی نمک استریل (۰/۹ Nacl درصد) بصورت سوسپانسیون‌های باکتریایی درآمد. با استفاده از محلول استاندارد نیم‌مک‌فارلند و به روش تعیین غلظت نوری (OD)، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu مدل UV 1280 ساخت کشور آمریکا)، در طول‌موج ۶۱۰ نانومتر، غلظت‌هایی در سطوح ۱/۵×۱۰^۶ CFU/ml، ۳×۱۰^۶ CFU/ml و ۴/۵×۱۰^۶ CFU/ml تهیه شد (Abdollahi-Arpanahi *et al*., 2018). سوسپانسیون‌های تهیه شده بر اساس تیمارهای آزمایشی به جیره‌های مورد نظر اضافه شد.

۲.۳. جیره‌های آزمایشی

در تحقیق حاضر از جیره‌ای با پروتئین خام (۵۱/۳۴ درصد)، چربی خام (۱۵/۷۴ درصد) و انرژی خام (۵۵۵۵ کالری بر گرم) یکسان استفاده شد (رحمانی، ۱۳۹۲). سوسپانسیون‌های تهیه شده در سه غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$، ۳×۱۰^{۶} و $۴/۵\times۱۰^{۶}$ واحد کلنی، به ترتیب تحت عناوین T1، T2 و T3 به همراه یک گروه شاهد یک فاقد هر گونه ماده افزودنی بود، به ۱۰۰ گرم از هر یک از جیره‌ها ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شدو به‌صورت همگن مخلوط شدند (Ghosh *et al*., 2004). مخلوط تهیه شده با عبور از چرخ‌گوشت به صورت رشته‌هایی به قطر ۲/۵-۲ میلی‌متر در آمد و به مدت ۱۰-۷ ساعت درون آون (BINDER مدل ED56، ساخت کشور آلمان) در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک شدند. پس از خرد کردن و گذراندن پلت‌ها از الک‌های ریز چشمه، مطابق با سایز دهانی لاروها استفاده شدند (Rawling *et al*., 2009). جیره‌های تهیه شده در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و شماره‌گذاری شدند و تا زمان مصرف در فریزر با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. تغذیه لاروها در طول دوره آزمایش به میزان ۵ درصد وزن بدن و ۴ نوبت در روز(ساعات ۸:۰۰ صبح، ۱۲:۰۰ ظهر، ۱۶:۰۰ بعد از ظهر و ۲۰:۰۰ شب) انجام شد.

۲.۴. شاخص‌های رشد

وضعیت رشد لاروها در ابتدا و انتهای دوره آزمایش بررسی شد. در پایان دوره لاروهای موجود در هر مخزن با ۱۰۰ mg/L میلی گرم در لیتر عصاره پودر گل میخک بی‌هوش شدند و وزن آن‌ها با ترازوی دیجیتال (Kern مدل KB360-3N، ساخت کشور آلمان) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. بر اساس داده‌های ثبت شده، شاخص‌های رشد و تغذیه با استفاده از فرمول‌های ریاضی مربوطه بر اساس منابع موجود ارزیابی شد (De Silva and Anderson, 1995).

۲.۵. اندازه‌گیری میزان آمونیاک و اوره

اندازه‌گیری میزان آمونیاک و اوره در انتهای دوره انجام شد. برای این منظور تعداد ۵ عدد ماهی بطور تصادفی از هر تکرار انتخاب شد و پس از توزین، به مدت ۲۴ ساعت بدون هوادهی در ظروف ۷ لیتری نگهداری شد. به‌منظور جلوگیری از تأثیر ترشحات نیتروژنی مربوط به باکتری‌ها و سایر میکروارگانیزم‌های آبزی همراه با نمونه تکرارهای آمونیاک و اوره، یک مخزن ۷ لیتری از همان آب اما بدون ماهی نیز به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، از آب هر ظرف به‌طور جداگانه نمونه برداری شد و سپس غلظت آمونیاک از طریق روش فنول- هیپوکلرید (اندو فنل) به صورت زیر تعیین شد (Solorzano, 1969).

مطابق این روش اندازه‌گیری غلظت آمونیاک انجام شد. مطابق این روش ابتدا ۵ میلی لیتر نمونه آب تهیه شد. ۰/۴mL محلول فنول نیتروپروکسید و ۰/۵ میلی لیتر محلول آلکالین هیپوکلریت به نمونه آب اضافه شد. نمونه آب به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. میزان جذب نمونه در طول‌موج ۶۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر (Shimadzu مدل UV 1280 ساخت کشور آمریکا) قرائت شد و در مرحله آخر عدد قرائت‌شده در معادله حاصل از نمودار کالیبراسیون غلظت‌های NH_4CL قرار داده شد. آمونیاک کل از تفریق مقدار به دست آمده با مقدار آمونیاک مخزن بدون ماهی به دست آمد. غلظت اوره با استفاده از آنزیم اوره آز محاسبه گردید (Elliott, 1976).

غلظت اوره نیز با استفاده از آنزیم اوره آز مطابق روش Elliott (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. در مرحله اول ۰/۵ میلی لیتر نمونه آب تهیه شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر آنزیم اوره آز به نمونه آب اضافه شد. در مرحله بعد ۰/۴ میلی لیتر محلول فنول نیتروپروکسید و ۰/۵ میلی لیتر محلول آلکالین هیپوکلریت به نمونه آب اضافه شد و محلول به دست آمده به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و میزان جذب آن در طول‌موج ۶۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. در مرحله آخر عدد قرائت‌شده در معادله حاصل از نمودار کالیبراسیون غلظت‌های NH_4CL قرار داده شد.

= نیتروژن اوره

مقدار نیتروژن آمونیاکی- (نیتروژن اوره+نیتروژن آمونیاک)

۲.۶. آزمون مقابله با استرس

بعد از اتمام دوره‌ی پرورش، برای بررسی عملکرد این میکروارگانیزم‌ها بر میزان مقاومت لاروهای ماهی، ۴ محیط استرس‌زا برای دادن شوک به لاروها آماده شدند که شامل شوک اسیدی (pH=2)، شوک قلیایی (pH=12)، شوک دما (۴۰ درجه سانتیگراد) و شوک آمونیاک (۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند. برای ایجاد شوک حرارتی با استفاده از بخاری الکتریکی مدرج، دمای مورد نظر تنظیم گردید. محلول‌های قلیایی و اسیدی به ترتیب با استفاده از سود (NaOH) و اسیدکلریدریک غلیظ ۳۷درصد تهیه شد و با استفاده از دستگاه و پی-اچ متر مدل هانا سنجش و کنترل گردیدند. تعداد ۵ قطعه هر تکرار به‌طور مجزا در حوضچه‌هایی که شامل محیط استرس‌زا (اسیدی، بازی، دما و آمونیاک) بود قرار گرفتند و میزان زمان زنده مانی لاروها در آن بعد از مرگ آخرین لارو موجود در مخزن به‌عنوان میزان مقاومت لاروها مشخص شد. میزان مقاومت لاروها در این مطالعه برحسب ثانیه تعیین شد. آزمایش در شرایط بدون غذادهی و اکسیژن‌رسانی به مخازن تحت مطالعه صورت پذیرفت (Abdollahi-Arpanahi et al., 2018).

۲.۷ . ترکیبات بیوشیمیایی عصاره بدن لاروهای ماهی

در انتهای دوره آزمایش برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن تمامی جمعیت باقیمانده از لاروها درون هر مخزن صید شد و با استفاده از عصاره پودر گل میخک (۱۰۰ mg/L) بیهوش شدند. نمونه‌ها جهت هموژنیزه شدن به دستگاه هموژنایزر الکتریکی (Raffaello مدلHA35 ، ساخت کشور ایتالیا) منتقل شدند. عملیات هموژنیزه شدن در حمام یخ انجام شد. بافر موردنظر شامل ۱۰۰ mM بافر Tris-HCL به همراه ۰/۱ mM ترکیب EDTA و ۰/۱ درصد Triton X-100 با pH برابر ۷/۸ بود. نمونه‌های هموژن شده درون فاکلون-های اپندروف با حجم ۱/۵cc منتقل شدند و درون دستگاه سانتریفیوژ با دورrpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند (Gomez-Gil *et al*., 1998).

سنجش غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم عصاره بدن لاروهای ماهی کپور معمولی با استفاده از کیت تجاری شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و با استفاده از دستگاه اوتوآنالایزر (ساخت اتریش) انجام شد (Shahsavani *et al*., 2010). گلوکز به روش آنزیمی-کالریمتری (King and Garner, 1947) و اندازه‌گیری هورمون کورتیزول با دستگاه الآیزا (Eurolyser، ساخت کشور بلژیک) و کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد (Asahina *et al*., 1995).

۲.۸. تجزیه و تحلیل آماری

تغییرات شاخص‌های اندازه‌گیری شده از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین بین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن بررسی شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ در محیط ویندوز انجام شد. مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

۳. نتایج

نتایج تأثیر مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیک و مخمر جدا سازی شده از دستگاه گوارش بچه فیل ماهیان انگشت قد بر شاخص‌های رشد لاروهای کپور معمولی در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج آزمون تجزیه واریانس یک طرفه وزن نهایی، ضریب رشد حرارتی و میانگین رشد روزانه در هر سه تیمار آزمایشی بالاتر از گروه شاهد بدست آمد($p<۰/۰۵$). بالاترین میزان این شاخص‌ها در گروه T3 اندازه‌گیری شد که در آن لاروها با غلظت ۱۰۶×۴/۵ از مخلوط پروبیوتیکی به مدت ۴۵ روز تغذیه شده بودند. فاکتور وضعیت نیز تغییرات معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان این شاخص (۱/۱۸) در تیمار T3 و بالاترین میزان آن در تیمار T2 (۱/۲۸) اندازه‌گیری شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- میانگین (sd±میانگین)شاخص‌های رشد و تغذیه لاروهای کپور معمولی

شاخص‌های رشد	شاهد	T۱	T۲	T۳
	سطوح پروبیوتیک CFU/100g			
وزن نهایی (mg)	۲۷۰± ۰/۱۰^{c}	۲۸۰± ۰/۰۷^{b}	۳۱۰± ۰/۱۰^{ab}	۳۵۰± ۰/۱۳^{a}
فاکتور وضعیت	۱/۲۳± ۰/۲۳^{ab}	۱/۲۲± ۰/۲۳^{ab}	۱/۲۸± ۰/۲۵^{a}	۱/۱۸± ۰/۲۶^{b}
ضریب رشد حرارتی (٪)	۰/۰۰۶± ۰/۰۰۷^{c}	۰/۰۰۶± ۰/۰۰۵^{bc}	۰/۰۰۸± ۰/۰۰۷^{ab}	۰/۰۰۹± ۰/۰۰۷^{a}
میانگین رشد روزانه (mg/d)	۱/۳۹± ۱/۲۲^{b}	۲/۱۶± ۲/۲۸^{a}	۲/۲۹± ۲/۳۷^{a}	۲/۵۴± ۲/۷۶^{a}

* در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشانه معنی‌دار بودن است (p<۰/۰۵).

تغییرات یون‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی عصاره بدن لاروهای کپور معمولی در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه واریانس یک طرفه غلظت یون سدیم در هر سه تیمار آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). اختلاف معنی داری در غلظت یون پتاسیم بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد(p>۰/۰۵). بالاترین غلظت یون کلسیم در تیمار T3 (۱۳/۹۰ mEq/l) و کمترین غلظت آن در تیمار T1 (۱۱/۶۶ mEq/l) اندازه‌گیری شد (p<۰/۰۵). میزان گلوکز عصاره بدنی لاروها در هر سه تیمار تحت تاثیر مخلوط پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۵). بالاترین میزان گلوکز در تیمار T2 اندازه‌گیری شد. میزان کورتیزول نیز در تیمارهای T1 و T2 بشکل معنی داری بالاتر از گروه شاهد و در تیمار T3 پایین تر از گروه شاهد اندازه‌گیری شد (p<۰/۰۵).

جدول۲- میانگین (sd±میانگین)شاخص‌های رشد و تغذیه لاروهای کپور معمولی

شاخص	شاهد	T۱	T۲	T۳
	سطوح پروبیوتیک CFU/100g			
سدیم(mEq/l)	۱۱۷/۶۶±۳/۰۸^{b}	۱۲۱/۶۶±۴/۷۲^{ab}	۱۲۱/۳۳±۵/۵۷^{ab}	۱۲۵±۳^{a}
پتاسیم(mEq/l)	۶/۲۴±۰/۳۴^{a}	۶/۳۰±۰/۵۲^{a}	۶/۷۰±۰/۳۴^{a}	۶/۲۶±۰/۲۰^{a}
کلسیم(mg/dl)	۱۱/۹۳±۱/۰۹^{ab}	۱۱/۶۶±۱/۳۰^{b}	۱۳/۱۳±۱/۲۸^{ab}	۱۳/۹۰±۰/۴۰^{a}
گلوکز(mg/dl)	۲۳۳/۶۶±۸۴/۹۸^{ab}	۳۰۷/۶۶±۸۰/۵۲^{a}	۳۸۶±۱۱۶/۷۷^{a}	۲۵۸±۱۳۴/۱۳^{a}
کورتیزول(ng/ml)	۱۰/۴۰±۲/۸۰^{b}	۱۱/۳۱±۲/۵۲^{a}	۱۱/۱۳±۱/۹۶^{ab}	۴/۹۸±۳/۹۱^{c}

* در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشانه معنی‌دار بودن است (p<۰/۰۵).

تغییرات میزان ترشح آمونیاک و اوره توسط لاروهای ماهی کپور معمولی در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری در میزان ترشح آمونیاک و اوره بین تیمارهای تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

در جدول ۴ تغییرات مدت زمان زنده مانی لاروهای ماهی کپور در آزمون مقابله با استرس‌های محیطی آورده شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در تمامی آزمونهای تحت بررسی مدت زمان زنده مانی لاروها در تیمارهای تحت تاثیر پروبیوتیک‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت و بالاترین مدت زمان زنده مانی لاروها در تمامی آزمون‌ها در تیمار T3 ثبت شد(p<۰/۰۵).

جدول۳- میانگین (sd±میانگین) تغییرات ترشح آمونیاک و اوره از لارو ماهی کپور معمولی

سطوح پروبیوتیک CFU/100g				
شاخص‌های رشد	شاهد	T۱	T۲	T۳
آمونیاک مترشحه (mg/g/day)	۰/۵۸±۰/۰۹[a]	۰/۸۹±۰/۰۲[a]	۱/۲۶±۰/۸۱[a]	۱/۴۵±۰/۶۲[a]
اوره مترشحه (mg/g/day)	۰/۱۴۵±۰/۰۲۲[a]	۰/۲۲۲±۰/۰۵[a]	۰/۳۱۵±۰/۲۰[a]	۰/۳۶۳±۰/۱۴۵[a]
نیتروژن مترشحه کل (mg/g/day)	۰/۷۲۵±۰/۳۱[a]	۱/۱۱۲±۰/۰۷[a]	۱/۵۷۵±۱/۰۱[a]	۱/۸۱۳±۰/۷۶۲[a]
انرژی اتلافی بر اساس آمونیاک مترشحه (ژول بر گرم در روز)	۱۴/۴۰±۲/۲۳[a]	۲۲/۱۰±۰/۵۰[a]	۳۱/۲۸±۲۰/۱۲[a]	۳۶/۰۰±۱۵/۳۹[a]
انرژی اتلافی بر اساس اوره مترشحه (ژول بر گرم در روز)	۳/۶۰±۰/۵۵[a]	۵/۵۱±۱/۲۴[a]	۷/۸۲±۴/۹۶[a]	۹/۰۱±۳/۶۰[a]
انرژی اتلافی کل (ژول بر گرم در روز)	۱۸/۰۰±۲/۷۸[a]	۲۷/۵۲±۱/۷۴[a]	۳۹/۱۰±۲۵/۰۸[a]	۴۵/۰۱±۴۰/۳۶[a]

* در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشانه معنی‌دار بودن است (p<۰/۰۵).

جدول۴- میانگین (sd±میانگین) تغییرات زمان زنده مانی (ثانیه) در لاروهای کپور معمولی در مقابله با تنش‌های محیطی

زمان زنده مانی برحسب ثانیه				
نوع تنش‌ها	شاهد	T۱	T۲	T۳
قلیائیت (pH =12)	۲۶۳/۰± ۵۰/۴[c]	۳۳۸/۶± ۲۷/۳[bc]	۳۶۷/۶± ۵۵/۰[ab]	۴۳۷/۳± ۲۱/۹[a]
اسیدیته (pH=2)	۳۷۹/۳± ۱۴/۰[b]	۴۱۸/۶± ۱۸/۵[b]	۴۹۹/۶± ۵۰/۲[a]	۵۶۰/۰± ۵۲/۰[a]
حرارت بالا (۴۰ درجه سانتی‌گراد)	۲۴/۳± ۱/۵[b]	۲۶/۳± ۳/۲[b]	۲۸/۶± ۳/۲[b]	۴۰/۳± ۰/۵[a]
آمونیاک بالا (۵ میلی‌گرم در لیتر)	۵۳۶/۳± ۸۵/۳[b]	۵۸۴/۰± ۱۳۹/۳[b]	۸۳۳/۳± ۲۵/۱[a]	۹۲۲/۳± ۸۰/۴[a]

* در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشانه معنی‌دار بودن است (p<۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که شاخص‌های رشد و تغذیه در تیمار مکمل سازی شده در غلظت CFU/100g ۴/۵×۱۰[۶] افزایش معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد داشت. در تائید این نتایج جعفریان و همکاران (۱۳۸۵؛۱۳۸۶) این‌چنین بیان داشتند که باسیلوس‌های پروبیوتیکی توانایی بالایی در افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و قابلیت هضم مواد غذایی داشته و بطور معنی‌داری رشد و کارآیی تغذیه را افزایش می‌دهند.

پروبیوتیک‌ها در بسیاری از موارد قادر به تاثیر گذاری بسیار بالایی بر فاکتورهای رشد در ماهیان می‌باشند که این تأثیرات از طریق فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها در بدن میزبان می‌باشد (Verschuere *et al*., 2000). تأثیرات پروبیوتیک‌ها بر ارتقاء عملکرد رشد در آبزیان توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Abdollahi-Arpanahi *et al*., 2018؛ Naderi samani *et al*., 2014؛ Jafaryan *et al*., 2011؛ Irianto and Austin, 2002؛ Gomez-Gil *et al*., 2000؛ Gatesoupe, 1999).

Ghosh و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از *Bacillus circulans* ایزوله شده از روده ماهی روهو (*Labio rohit*) در غلظت ۱۰[۵] باکتری در هر گرم جیره غذایی شاهد افزایش معنی‌دار وزن نهایی، نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی بودند. استفاده از باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک که از دستگاه گوارش فیل‌ماهی و تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) استخراج شده بود نیز تأثیرات مثبتی بر عملکرد رشد و بقای لاروهای هر دو گونه داشت (Askaryan, 2008).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، میزان

هورمون کورتیزول در گروه شاهد دارای بالاترین مقدار بود و در گونه‌هایی که پروبیوتیک دریافت کرده بودند سطح این هورمون به شکل معنی‌داری کاهش یافته بود. این نتایج نشانگر تاثیر مثبت پروبیوتیک‌های باسیلی در کاهش میزان ترشح کورتیزول و در نتیجه کاهش میزان استرس است. با توجه به آزمایشات انجام شده توسط Barton و همکاران در سال ۱۹۸۷ و Wendelaar در سال ۱۹۹۷ میزان تغییرات کورتیزول بطور معمول به‌عنوان یک نشانگر از میزان استرس تجربه شده توسط ماهی محسوب می شود. Thrall و همکاران در سال ۲۰۰۴ میزان طبیعی کلسیم سرم خون ماهیان پرورشی را ۲۰mg/dl گزارش دادندکه نتایج این تحقیق در مقایسه با عدد مذکور پایین‌تر بود. Sano در سال ۱۹۶۰ سطح کلسیم خون ماهیان پرورشی را طی فصل تابستان بالاتر از فصل زمستان گزارش داد و این تغییرات را در ارتباط با تغییرات نور خورشید و دمای محیط دانست. وی معتقد است سطوح کلسیم سرم تحت تاثیر آب محیط پرورش نیست و ممکن است کلسیم جیره غذایی از عوامل مؤثر بر کلسیم خون باشد. Thrall و همکاران در سال ۲۰۰۴ میزان سدیم و پتاسیم را در خون ماهیان آب شیرین به ترتیب ۱۵۰ mEq/l و ۳ گزارش کردند. در مطالعه حاضر بالاترین میزان سدیم ۱۲۵ mEq/l و پتاسیم ۶/۷۰ mEq/l اندازه‌گیری شد.

تحقیقات مختلف نشان داده است که پروبیوتیک‌ها نقش مهمی تجزیه مواد آلی، کاهش میزان نیتروژن و سطح فسفر بازی می‌کنند و به‌خوبی مقدار آمونیاک، نیتریت و سولفید هیدروژن را کنترل می‌کنند (Panigrahi *et al*., 2004). نتایج این تحقیق نشان داد که اضافه کردن پروبیوتیک‌های باسیلی به جیره غذایی لاروهای کپور معمولی تاثیر معنی‌داری بر میزان ترشح آمونیاک و اوره نداشت. در تائید این نتایج Moazami و همکاران (۲۰۱۵) نیز با بررسی تأثیر جیره‌های غذایی مکمل سازی شده توسط مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نکردند. Dong و همکاران (۲۰۰۰) گزارش دادند که با توجه به شیوه فعالیت‌های اکولوژیکی پروبیوتیک‌ها و همین‌طور بهینه‌سازی نرخ نیتریفیکاسیون[1] و دنیتریفیکاسیون[2] این محصولات اگر بیش‌ازحد مطلوب مورد استفاده قرار گیرند باعث ایجاد تأثیرات منفی در فیزیولوژی مواد مغذی و درنتیجه کاهش عملکرد رشد و افزایش ترشح متابولیت‌های مختلف در آب نگهداری ماهیان می‌شوند.

در پرورش لاروهای آبزیان بالا بردن توان مقاومت لارو از اهمیت بسیار فراوانی برخوردارست. با توجه به اینکه لاروهای ماهی ممکن است در معرض انواع شرایط و استرس‌های سخت محیطی قرار گیرد، لذا بکار گرفتن تکنیک‌هایی که بتواند این نیاز مهم را تأمین نماید از مهم‌ترین موارد قابل‌توجه محسوب می‌گردد (Moriarty, 1998). گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها در لاروهای آبزیان باعث افزایش مقاومت لاروها در برابر استرس‌های محیطی شده‌اند (Verschuere *et al*., 2000). نتایج این تحقیق نشان داد تغذیه لاروهای کپور معمولی با غلظت $۴/۵\times۱۰^{۶}$CFU در هر ۱۰۰ گرم از جیره غذایی باعث افزایش مقاومت لاروها در برابر استرس‌های دمای بالا، آمونیاک بالا، شرایط اسیدی و شرایط بازی می‌گردد. نتایج مشابهی توسط Faramarzi (۲۰۱۱) در خصوص آزمون‌های مقابله با شوک‌های محیطی ذکرشده روی لاروهای تاس ماهی ایرانی در به‌کارگیری از پروبیوتیک‌های باسیلی به دست آمد.

درمجموع نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح مختلف سوسپانسیون پروبیوتیک‌های باسیلی و مخمر جدا شده از دستگاه گوارش فیل‌ماهیان انگشت قد توانایی تأثیرگذاری مطلوبی روی شاخص‌های رشد و مقاومت لاروهای کپور معمولی در مواجه با استرس‌های محیطی را داشتند؛ اما تاثیر معنی‌داری بر میزان ترشح آمونیاک و اوره و انرژی اتلافی بر اساس ترشح این متابولیت‌ها نداشتند.

[1] Nitrification
[2] de nitrification

References

۵. منابع

Abdollahi Arpanahi, D., Jafaryan, H., Soltani, M., Naderi Samani, M., Hasanpour Fatahi, A., 2019. Comparision of Commercial and Indigenous Bacillus (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) Effects on Some Immune Responses and Serum Enzymes Activity in Whiteleg Shrimp Post-Larvae (Litopenaeus vannamei). *Journal of Veterinary Research* 74(1), 84-92. (in Persian).

Abdollahi-Arpanahia, D., Soltanib, E., Jafaryana, H., Soltan, M., Naderi-Saman, M., Campa-Córdova, A.I., 2018. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immune o-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 496, 43-49.

Allameh, S.K., Yusoff, F.M., Ringø, E., Daud, H.M., Saad, C.R., Ideris, A., 2016. Effects of dietary mono-and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquatic Nutrition* 22(2), 367-373.

Asahina K., Kanbegawa A., Higashi T. 1995. Development of a microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assay for 17a, 20h-21-trihydroxy-4-pregnen-l-one, a teleost gonadal steroid. *Fisheries Science* 61(-), 491- 494.

Askaryan, F., 2008. Investigation of the effects of using probiotics obtained from the bacterial flora of the gastrointestinal tract on the growth indices of two species of elephant fish (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipnser persicus*). Ph.D. thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch 218p. (in Persian)

Barton, B.A., Schreck, C.B., andSigismondi, I.A., 1987. Changesin plasma cortisol during stress and smoltification in *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 59(3), 468-471.

Chi, C., Jiang, B., Yu, X.B., Liu, T.Q., Xia, L., Wang, G.X., 2014. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology* 36(1), 9-18.

Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology* 39, 939-942.

De Silva, S.S., Anderson, T.A., 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman & Hall, London 319p.

Dehghan, M., 2011. Isolation and selection of probiotic and yeast bacteria from the gastrointestinal tract of juvenile elephant fish (*Huso huso*) and evaluation of enrichment capability with *Artemia urmiana nauplii*. Master thesis, Gonbad Kavous University 123p. (in Persian).

Dehghan, M., Jafariyan, H., Habibi Rezai, M., Amoozagar, M.A., Sahand, J., 2011. Potential of Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Enrichment with two Species of Bacillus and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *World Journal of Fish and Marine Science* 3(6), 523-528.

Dong, H., Fredrickson, J.K., Kennedy, D.W., Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Onstott, T.C., 2000. Mineral Transformation associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology* 169, 299-318.

Elliott J.M. 1976. Energy losses in the waste products of brown trout (*Salmo trutta* L). *Animal Ecology* 45, 561–580.

FAO (Food and Agriculture Organization)., 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Food and Agriculture Organization FAO, Rome 209p.

FAO (Food and Agriculture Organization)., 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome p. 210.

Faramarzi, M., 2011. Enrichment of *Daphnia Magna* with *Bacillus circulans* and *Bacillus licheniformis* to improve growth and nutrition criteria, survival rate, resistance to environmental stresses and reduction of ammonia secretion in Iranian sturgeon larvae. Master thesis of Gonbad Kavous University 132p. (in Persian)

Faramazi, M., Kiaalvandi, S., Lashkarbolooki, M., Iranshahi, F., 2011. The investigation of Lactobacillus acidophilus as probiotics on growth performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 6(1), 32-38.

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

Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *bacillus circulans*, in Formulated diets for Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings. *Aquaculture- Bamidgeh* 55(1), 13-21.

Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2004. Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) spawn feed diets formented with intestine bacterium, *Bacillus circulans*. *Acta Ichthyologica et piscatoria* 34(2),155-165.

Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Aberu-Grobis, F.A., Roque, A., 1998. Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the Brine shrimp (*Artemia fransiscana*). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2318-2322.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191(1-3), 259-270.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Lactobacillus sakei BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to *streptococcosis* infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish & shellfish immunology* 29(6), 1037-1043.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Potential use of probiotic- and triherbal extract-enriched diets to control *Aeromonas hydrophila* infection in carp. *Diseases of Aquatic Organisms* 92, 41-49.

Hassanpour fatahi, A., 2013. Effect of Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus niger yeast isolated from adult elephant digestive tract on growth performance and survival of young *Huso huso*. Master thesis, Gonbad Kavous University 166p. (in Persian).

Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotic in aquaculture, *Journal of Fish Diseases* 25, 1-10.

Jafarian H.A., Azari Takami, G, Kamali, A., Soltani M., Habibi Rezaei, M., 2007. The use of probiotic bacillus bioencapsulated with *artemia urmiana* nauplii for the growth and survival in *Acipenser persicus* larvae. *Journal of agricultural sciences and natural resources* 14(2), 77-87. (in Persian)

Jafaryan, H., 2006. The effect of *Bacillus* bacteria as probiotics on growth, survival and activity of digestive enzymes in larvae of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval rearing by enrichment with *Artemia urmiana*. PhD thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan. (in Persian).

Jafaryan, H., Soltani, M., Noferesti, H., Ebrahimi, P., 2011. Effect of adding probiotics into the rearing tanks of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) for the exploitation of *Artemia urmiana*, *Artemia fransiscana*, Nauplii. *International Journal of Veterinary Research* 3, 125-128.

Jafaryan, H., Soltani, M., Taati, M., Nazarpour, A., Morovat, R. 2011. The comparison of performance of isolated sturgeon gut bacillus (acipenser persicus and huso huso) with commercial microbial products on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykis*) larvae. *Journal of veterinary research* 66(1), 39-46. (in Persian).

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Kimura, T., 1988. Screening of bacteria with antibacterial activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiology and Immunology* 32, 67-73.

King E.J. and Garner, R.J., 1947. The Colorimetric Determination of Glucose. *Journal of clinical pathology* 1(1), 30–33.

Ma, G.W., Cho, Y.S., Oh, K.H., 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogen by Lactobacillus spp. JK-8- JK-11. *Aquaculture* 287, 266-270.

Michael, E.T., Amos, S.O., Hussaini, L.T., 2015. A review on probiotics application in aquaculture. *Fisheries and Aquaculture Journal* 5(4), 1-3.

Moazami, N., Jafaryan, H., Ebrahimi, P., Gholipour kananni, H., 2015. The effect of A-max and celmanax yeast commercial products on energy losing based on ammonia and urea execration in common carp (*Cyprinus carpio*) in comparison with probiotic bacilli. International conference on sustainable development with a focus on agriculture and tourism 16-17 September, Tabriz, Iran pp. 16-22.

Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture pond. *Aquaculture* 164, 351-358

Munirasu, S., Ramasubramanian, V., Arunkumar, P., 2017. Effect of Probiotics diet on growth and biochemical performance of freshwater fish *Labeo rohita* fingerlings. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(3), 1374-1379.

Naderi Samani, M., Jafarian, H., Gholipour Kanani, H., Harsij, M., 2014. Bioremediation of the effluent of cultivation pond of Common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) using probiotic bacillus for reuse rearing system. *Journal of Applied Ichthyological Research* 2, 51-62.

Ngan, P.T.T., Phu, T.Q., 2011. Effects of *Bacillus* bacteria (B8, B37, B38) on water quality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured tanks. Proceedings of the 4th aquaculture and fisheries conference pp. 28-41.

Olsen, R.E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M., Ring, E., 2001.Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture research* 32, 931- 934.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379-388.

Prasad, L., Baghel, D.S., Kumar, V. 2003. Role and prospects of probiotics use in aquaculture. *Aquaculture* 4(2), 247- 251.

Rawling, M., Merrifield, D.L., Davies, S.J. 2009. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture* 294, 118-122.

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(3-4), 301-313.

Sano, T. 1960. Haematological studies of the culture fishes in Japan 2. Seasonal variation of the blood constituents of rainbow trout. *Journal of Tokyo University of Fisheries* 46, 67-75.

Shahsavani, D., Mohri M., Gholipour Kanani H., 2010. Determination of normal values of some blood Serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology and Biochemistry* 36(11), 39-43.

Solorzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method, *Limnology and Oceanography* 14, 799–801.

Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, E.A., 1963. The microbial world. Prentice- Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey pp.153-156.

Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., Denicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., Rebar, A., Weiser, G., 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, USA 501p.

Vergio, F. 1954. Anti-Und Probiotika. *Hippokrates* 25, 16-119.

Verma, G., Gupta, A., 2015. Probiotics application in aquaculture: improving nutrition and health. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 3(1), 53-64.

Verschuere, L., Rombaut,G., Sorgeloos, P., W. Verstraete., 2000. Probiotic bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbilogy and Molecular Biology Reviews* 64(4), 655-671.