شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحات ۴۱۶-۴۰۱

بررسی اثرات جیره‌های غذایی حاوی باکتری‌های ریزپوشانی شده *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 با آلژینات سدیم و کیتوزان بر رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

امیر ویسی[۱]، حسین اورجی[۲*]، غلامرضا رفیعی[۳]، فرید فیروز بخش[۲]، عبدالصمد کرامت[۲]

۱. دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳. استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳

چکیده

یکی از مهمترین مشکلات استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی پروری، میزان بالای مرگ و میر آن‌ها در شرایط فرآوری، انبارداری و حضور در دستگاه گوارش آبزیان است. یکی از جدیدترین روش‌ها برای محافظت و افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها، روش ریزپوشانی است. ریزپوشانی، پروبیوتیک‌ها را در مقابل فرآیندهای عمل آوری، شرایط نامساعد دستگاه گوارش و شرایط محیطی مکان ذخیره آن‌ها محافظت می‌کند. در این تحقیق ابتدا پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* با پوشش‌هایی از جنس آلژینات سدیم و کیتوزان ریزپوشانی شد و میزان زنده مانی و توان این پروبیوتیک در تحمل pH صفرا و شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس پروبیوتیک‌های ریزپو شانی شده با روش ا سپری به پلت‌های(حبه‌های) غذایی افزوده شد و به مدت ۶۰ روز در اختیار بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن میانگین وزن اولیه (۰/۱۷±۶/۲۳) گرم قرار داده شد. در پایان دوره آزمایش، نتایج نشان داد که پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده نسبت به پروبیوتیک‌های آزاد در برابر شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از میزان مقاومت بیشتری برخوردارند. همچنین نتایج مربوط به بررسی شاخص‌های رشد نشان داد که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان از لحاظ فاکتورهای رشد از قبیل از قبیل میزان رشد روانه با میانگین (۰/۴۸) گرم، افزایش وزن با میانگین (۰/۶۳±۲۸/۸) گرم و درصد افزایش وزن با میانگین (۱۶/۶۳±۴۶۸/۳۷) نسبت به ماهیان تیمار شاهد در شرایط بهتری بودند (P<۰/۰۵).

واژگان کلیدی: آبزی پروری، پروبیوتیک، ریزپوشانی، رشد، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* نویسنده مسئول: حسین اورجی
Email: hoseinoraji@yahoo.com

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 3, Autumn 2021
pp. 401-416

Evaluation of the effects of diets containing *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 microencapsulated with sodium alginate and chitosan on the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Amir Veisi[1], Hosein Ouraji[2*], Gholamreza Rfiei[3], Farid Firoozbakhsh[2], Abdolsamad Keramat[2]

1. PhD Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agriculture and Natural Resources, Sari, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agriculture and Natural Resources, Sari, Iran
3. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 08-Nov-2020 **Accepted: 14-Des-2020**

Abstract

One of the most important problems in using probiotics in the aquaculture industry is their high mortality rate due to selection of processing conditions before using, storage methods and their adaptation in digestive ducts of aquatic animals. The newest methods to protect and increase the stability of probiotics in intestinal aquatic animal ducts is microencapsulation method. Microencapsulation keep the quality of the probiotics due to production processes, unfavorable gastrointestinal conditions, and environmental storage conditions. In this study, the first *Lactobacillus rhamnosus* as a probiotic coated with sodium alginate and chitosan, then the viability and potency in tolerating bile pH and stomach simulated conditions in rainbow trout (*Oncorhynchu smykiss*) were evaluated. After that, microencapsulated probiotics were added to the food pellets by spraying method and were given to rainbow trout juveniles with an average initial weight of 6.23 ± 0.17 g for a period of 60 days. At the end of the experiment, the results showed that the microencapsulated probiotics were more resistant to the stomach simulated conditions in rainbow trout in comparison with the free probiotics treatment as control. Also, the results showed that the growth indices in the treatment, the fish fed feed containing the sodium alginate-chitosan -microencapsulated probiotics had average daily weight gain 0.48 g, weight gain 28.8 ± 0.63 g and weight gain percentage 468.37 ± 16.63% and more efficient than the control treatment ($P < 0.05$).

Keywords: Aquaculture, Probiotic, Microencapsulation, Growth, Rainbow trout.

Corresponding author: Hosein Ouraji Email: hoseinoraji@yahoo.com

۱. مقدمه

میزان مصرف ماهی در طول سال‌های گذشته همواره با روند رشد صعودی همراه بوده است و از ۴۵ میلیون تن در سال ۱۹۷۳ به بیش از ۱۳۰ میلیون تن در سال ۲۰۰۰ افزایش یافته است و فائو تخمین میزند تا سال ۲۰۳۰ حدود ۴۰ میلیون تن دیگر به میزان مصرف غذاهای دریایی افزوده خواهد شد (FAO, 2004). بنابراین جهت پاسخگویی به تقاضای روبه افزایش برای غذا و با توجه به کاهش ذخایر طبیعی ماهیان، ایجاد جایگزین‌های پایدار امری ضروری است که به دلیل کاهش منابع طبیعی ماهیان، سهم عمده تولید بر عهده بخش آبزی پروری قرار گرفته است (Borgeson and Tracy, 2005). یکی از مهم‌ترین چالش های پیش روی صنعت آبزی پروری موضوع بیماری‌های آبزیان است. بطوریکه سالانه میلیون‌ها دلار به این صنعت خسارت وارد می‌کند. رشد جمعیت و افزایش تقاضای بشر برای غذاهای دریایی، رشد و گسترش روزافزون آبزی پروری در سرا سر دنیا و ورود فناوری‌های جدید و پیشرفته به این صنعت را به همراه داشته است. از این رو همگام با توسعه صنعت آبزی پروری، ورود و استفاده از شیوه‌های موثر و کارآمدتر برای مقابله با بیماری‌ها آبزیان نیز بیش از پیش گسترش یافته است (Zorrieh Zahra *et al.*, 2015). برای مهار بیماری های باکتریایی، آنتی بیوتیک ها پرکاربردترین مواد در درمان آبزیان بیمار بشمار می‌آیند (Spkota *et al.*, 200)، اما استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها مضراتی مانند تجمع این مواد در پیکره‌ی آبزیان و ایجاد مقاومت دارویی در آن‌ها، انتقال این مواد به انسان‌ها و ورود آن‌ها به منابع آبی و انتقال ژن مقاوم به آنتی بیوتیک به باکتری های دیگری است که در معرض آنتی بیوتیک قرار نگرفته‌اند (Witte *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2008; Zilberg *et al.*, 2010; Peredo *et al.*, 2015) و حجم بالای داروها و آنتی بیوتیک‌های وارد شده به آب محیط پرورش می‌تواند تمامیت جامعه میکروبی دستگاه گوارش را تحت تاثیر قرار دهد و میزان رشد و توانایی ایمنی را کاهش دهد (Oliana *et al.*, 2006). از دیگر روش های مبارزه با عوامل بیماری‌زا واکسن‌ها هستند که به منظور تحریک ایمنی اختصاصی به کار گرفته می‌شوند (Bol *et al.*, 2016). استفاده از واکسن‌ها در صنعت آبزی پروری نیز با مشکلات خاص خود همراه هستند که از جمله آن می‌توان به هزینه بالای تولید آن‌ها، دشوار بودن عمل تزریق، ایجاد استرس و مشکلات مربوط به استفاده از آن در محیط های آبی اشاره کرد. همچنین علاوه بر مشکلات بهداشتی و تولیدی، اغلب واکسن‌های مورد استفاده در ایران، متناسب با سویه‌های بومی کشور تهیه نشده‌اند (Olafsen, 2001;Ahmadivand *et al.*, 2015). به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه بیشتری برای استفاده از پروبیوتیک ها در آبزی‌پروری به عنوان یک استراتژی موثر و پایدار به منظور بهبود توان مقابله با بیماری‌ها ایجاد گردید و گرایش به مدیریت نحوه تغذیه و دستکاری جامعه میکروبی دستگاه گوارش آبزیان با توجه به اثرات مفیدی که بر سلامت میزبان می‌گذارند افزایش یافته است (Chen *et al.*, 2020). یکی از انواع باکتری‌های پروبیوتیکی که بیشترین استفاده را در آبزی پروری دارند لاکتوباسیلوس‌ها هستند (Nayak, 2010). لاکتوباسیل‌ها باکتری‌های گرم مثبت و میله‌ای شکل هستند که تنفس بی هوازی اختیاری دارند و نقش آن‌ها در افزایش رشد و تحریک افزایش ایمنی بدن در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پیش از این به اثبات رسیده است (Panigrahi *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2013). گونه *L. rhamnosus* یکی از انواع لاکتوباسیلوس‌ها است که نقش مثبت استفاده از آن بر رشد و ایمنی آبزیان نیز پیش از این به اثبات رسیده است (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*, 2010; Pirarat *et al.*, 2015). یک مشکل عمده که در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری وجود دارد این است که پروبیوتیک‌ها عمدتا توان تحمل شرایط اسیدی معده و آنزیم‌های صفراوی را ندارند و میزان زنده مانی آنها از مرحله انبار تا رسیدن به روده میزان به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد و همین عامل باعث می‌شود که پروبیوتیک‌ها در روده کارایی لازم

و قابل انتظار را نداشته باشند (Kailasapathy, 2008; Pinpimai *et al.*, 2015)، زیرا برای مشاهده اثرات مفید پروبیوتیک‌ها لازم است که این میکروارگانیسم‌ها به صورت زنده و به تعداد کافی به روده برسند و خود را در آنجا مستقر نمایند (Kailasapathy, 2008).

به همین دلیل محققان در طی سال‌های اخیر همواره به دنبال یافتن راهی برای محافظت از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط نامساعد دستگاه گوارش میزبان بوده‌اند. یکی از جدیدترین روش‌ها برای پایداری پروبیوتیک‌ها، روش ریزپوشانی است. در فرآیند ریزپوشانی، دارو ها، پروبیوتیک‌ها یا سایر موارد مورد نظر توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوییدی به دام انداخته می شوند. در نتیجه این مواد از شرایط نام ساعد محیطی دور نگه دا شته می شوند و از آن‌ها در برابر شرایطی مثل pH پایین، نمک های صفراوی، شوک های گر مایی، باکتریوفاژها و مواد مضر آنتی بیوتیکی تا زمان ر سیدن به بافت هدف و رهایش کنترل شده و متوازن محافظت می‌شود. ریزپوشانی همچنین با عث می‌شود که باکتری‌های پروبیوتیک به صورت فعال باقی بمانند و به صورت کنترل شده در روده یا سایر بافت‌های هدف آزاد گردند.

از ترکیبات مختلفی برای پوشش پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود که رایج‌ترین آن‌ها عبارتند از: آلژینات‌ها، گزانتان، ژلان، کاراجینان، ژلاتین، سلولز، کیتوزان و غیره. این مواد که خود پری‌بیوتیک محسوب می‌شوند، تحت شرایط ویژه‌ای مانند دما، pH, فشار، تخمیر و وجود برخی آنزیم‌ها محتویات خود را رها می کنند (Mortazavian *et al.*, 2007; Rokka and Rantamaki, 2010).

بیش از ۲۵ درصد از تولید تجاری آزاد ماهیان را قزل‌آلای رنگین‌کمان به خود اختصاص داده است و بر اساس آمار فائو نقش مهمی در زنجیره غذایی انسان دارد (FAO, 2011). در روند پرورش این گونه اثر مثبت استفاده از پروبیوتیک ها به اثبات رسیده است (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*, 2010; Adineh *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013; Yazici *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020) ولی در ارتباط با استفاده از روش‌های جدید مبتنی بر افزایش کارایی تأثیر پروبیوتیک‌ها از طریق ریزپوشانی آن‌ها، گزارش کمی وجود دارد. لذا، در این پژوهش سعی شد با ریزپوشانی پروبیوتیک و انتقال آن از طریق غذا به بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، اثرات آن بر شاخص‌های رشد مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه نمونه باکتری

در این تحقیق از باکتری *Lactobacillus rhamnosu* JCM 1136 فریز شده در گلیسرول و از گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه گردید. نمونه‌های پروبیوتیک پس از تهیه، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در ml ۴۰ میلی لیتر محیط کشت TSA و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد فعال گردیدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در ml ۲۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (Tookmehchi *et al.*, 2012).

۲,۲. روش ریزپوشانی باکتری‌ها

ریزپوشانی باکتری‌ها با آلژینات سدیم در شرایط ا ستریل و به روش امول سیون انجام شد. برای این منظور ابتدا باکتری‌های ک شت داده شده در محیط ک شت مایع MRS به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصله سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. رسوب بدست آمده در انتهای لوله‌های سانتریفیوژ در محلول PBS بصورت سو سپان سیون درآمد و به کمک لوله‌های ا ستاندارد مک فارلند با غلظت $۱/۸ \times ۱۰^{۸}$ باکتری زنده در هر میلی لیتر تنظیم شدند. سپس یک قسمت از سوسپانسیون باکتریایی با چهار قسمت سدیم آلژینات مخلوط شد. یک قسمت از مخلوط فوق به صورت قطره چکان به ۵ قسمت از روغن نباتی حاوی ۲درصد توئین۸۰ اضافه شد و با هم زن مغناطیسی به طور یکنواخت مخلوط گردید. بعد از حدود ۱۰ دقیقه یک امولسیون کدر یکنواخت ایجاد

گردید و سپس کلسیم کلرید (۰/۱ M) به آرامی و با سرعت (۲۰ ml/s) به آن اضافه گردید تا زمانیکه امولسیون آب و روغن از هم قابل تفکیک شدند. بعد از ۱۰ دقیقه کپسول‌ها تشکیل شدند و سپس با سرعت ۳۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و از هم جدا شدند و با آب مقطر مورد شستشو قرار گرفتند. سپس فاز روغن با یک سرنگ از فاز آبی حاوی کپسول‌های آلژینات سدیم جدا گردید (Sheu *et al.*, 1993). برای تهیه محلول کیتوزان به منظور ریزپوشانی کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم نیز مطابق روش Sarmento و همکاران (2007) با کمی تغییرات عمل گردید. به این ترتیب که ابتدا ۰/۴ گرم کیتوزان در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر اسیدی شده با ۰/۴ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل گردید. سپس pH محلول حاصل با اضافه کردن NaoH ۱ مولار به حدود ۶ رسید و در اتوکلاو و در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۷ دقیقه استریل شد. در مرحله بعد کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم به محلول کیتوزان انتقال داده شد و به خوبی با هم مخلوط شدند و در انتها دو مرتبه با سرم فیزیولوژی مورد شستشو واقع شدند. در مرحله بعد به منظور تعیین میزان پروبیوتیک‌های زنده ریزپوشانی شده حدود ۰/۵ گرم از کپسول‌های حاوی پروبیوتیک به ۲ میلی گرم محلول سدیم سیترات ۰/۱ مولار اضافه گردید و به منظور آزاد شدن کامل باکتری‌ها در بافر، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بطور یکنواخت تکان داده شد. سپس رقت سریالی 10^{1} تا 10^{8} تهیه شد و ۱۰۰ میلی لیتر از هر رقت در داخل پلیت MRS آگار ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد کلنی‌های تشکیل شده در قالب سه تکرار مورد بررسی و شمارش قرارگرفتند (Sohail *et al.*, 2011). بخشی از آن‌ها نیز به منظور تعیین پتانسیل زتا به آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه تهران انتقال داده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، تعداد باکتری‌های زنده به دام افتاده شده در کپسول‌های آلژینات سدیم $10^{8} \times 0/07 \pm 1/65$ محاسبه شد، به این معنی که بازده ریزپوشانی ۹۱ درصد بود و تعداد باکتری‌های زنده به دام افتاده شده در کپسول‌های آلژینات سدیم-کیتوزان $10^{8} \times 0/09 \pm 1/58$ محاسبه شد به این معنی که بازده ریزپو شانی ۸۷ در صد بود. برر سی میزان پتانسیل زتای ذرات نیز نشان داد که میانگین پتانسیل زتای مربوط به ذرات ریزپو شانی شده با آلژینات سدیم ۳۲/۸ mv- و آلژینات سدیم-کیتوزان ۳۴/۳ mv- بود.

۲.۳. بررسی توان زنده مانی باکتری‌های ریزپو شانی شده در شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

جهت تهیه شیره معده ابتدا محلول الکترولیت حاوی ۲۳/۶ گرم در لیتر کلرور سدیم، ۲/۲۹ گرم در لیتر کلرور پتا سیم، ۰/۲۲۹ گرم در لیتر کلرور کلسیم و ۱/۲ گرم در لیتر بیکربنات سدیم به شکل استریل تهیه و pH آن به وسیله اسید کلریدریک ۸ نرمال تا ۲±۰/۲ کاهش داده شد. در حین انجام آزمایش، آنزیم پپسین تا غلظت نهایی ۰/۳ درصد به آن افزوده گردید (Vizoso *et al.*, 2006). سپس مقدار ۱ گرم از کپسول‌های باکتریایی داخل تیوب حاوی ۹ میلی لیتر از شیره معده ریخته شد و برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در حال شیک قرار داده شد و در فواصل زمانی صفر، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه تعداد سلول‌های زنده در نمونه‌های حاوی پروبیوتیک به صورت آزاد با استفاده از روش رقیق سازی توسط پپتون واتر در محیط MRS آگار کشت داده شد و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شمارش گردیدند. این کار با ۳ تکرار برای هر نمونه انجام گردید (Rezaei Mokarram *et al.*, 2010).

۲.۴. تهیه جیره غذایی و غذا دهی

غذادهی به میزان ۳ در صد وزن توده زنده بطور روزانه در سه نوبت به طور دستی و در ساعت‌های مشخص (۸، ۱۳ و ۱۸) انجام گرفت. به ازای هر گرم غذا مقدار $10^{8} \times 1/8$ باکتری ریزپوشانی شده در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شد و روی غذای

خریداری شده از یکی از شرکت‌های تجاری با مشخصات ارایه شده در جدول ۱، اسپری گردید و اجازه داده شد غذا به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در یک محل تمیز، خشک گردد. در غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی اسپری گردید. به منظور بررسی اثرات استفاده از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد، این کپسول‌ها به مدت ۶۰ روز از طریق روش غذادهی در اختیار ماهیان قرار گرفتند (Cordero *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2016).

جدول ۱- نتایج تجزیه تقریبی جیره غذایی مورد استفاده برای ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی با لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده (میانگین±انحراف معیار)

تجزیه تقریبی / نوع خوراک	پروتئین خام (٪)	چربی خام (٪)	خاکستر خام (٪)	فیبر (٪)	فسفر (٪)	رطوبت (٪)
GFT_1	۴۵±۲/۳	۱۴±۰/۹	۱۳±۱/۱	۲/۵±۰/۶	۱/۵±۰/۵	۱۱±۱/۲

۲.۵. طرح آزمایش

برای این منظور تعداد ۲۲۵ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد با میانگین وزن اولیه (۶/۲۳±۰/۱۷) گرم از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهی در کرج تهیه شدند. تمام بچه ماهیان خریداری شده از یک والد و دارای برگه بهداشتی بودند که به طریق کاملا استاندارد به کارگاه انتقال داده شدند. ماهی‌ها در قالب پنج تیمار و هر تیمار با سه تکرار در تراف‌های کالیفرنیایی با ابعاد ۱۵ × ۳۰ × ۲۲۰ سانتیمتر به گونه‌ای توزیع شدند که در شروع آزمایش از لحاظ بیومس یا زیست توده اختلاف معنی‌داری بین تراف‌ها وجود نداشت. نحوه چیدن تراف‌ها به صورت تصادفی بود و ماهی‌ها به مدت ۱۴ روز در تراف‌ها نگهداری و با غذای تجاری تغذیه شدند تا با شرایط تراف‌ها سازگار شوند. منبع آب کارگاه از یک حلقه چاه عمیق تامین گردید و آب به طور دائمی با جریان ۶ لیتر بر دقیقه وارد تراف‌ها شد و آب اضافی از طریق لوله‌های خروجی از کف هر تراف خارج شد (Chen *et al.*, 2020: Kong *et al.*, 2020). در تیمار اول (T_1): ماهیان با $۱/۸ \times ۱۰^۸$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم مورد تغذیه قرار گرفتند. در تیمار دوم (T_2): ماهیان با $۱/۸ \times ۱۰^۸$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمار سوم (T_3): ماهیان با $۱/۸ \times ۱۰^۸$ CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول مورد تغذیه قرار گرفتند. در تیمار چهارم (T_4): ماهیان با کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک مورد تغذیه قرار گرفتند و در تیمار شاهد (T_5): ماهیان با پلت‌های تجاری فاقد کپسول و پروبیوتیک مورد تغذیه قرار گرفتند (Chandramouli *et al.*, 2004; Pirarat *et al.*, 2015).

۲.۶. اندازه‌گیری شاخص‌های کیفی آب

اندازه گیری شاخص‌های کیفی آب همچون دمای آب، اکسیژن محلول و pH به صورت هفتگی انجام گرفت (Tahmasebi Kayhani *et al.*, 2008). میانگین دمای آب کارگاه در طول دوره ۱±۱۵ درجه سانتیگراد، اکسیژن محلول ۰/۵±۷/۴ میلی‌گرم در لیتر، pH ۰/۴±۷/۶ و سختی آب ۲/۷±۲۳۷ میلی گرم در لیتر بود. فضولات و دیگر مواد باقیمانده در کف تراف ها هر روز از مخازن سیفون شد (Tahmasebi Kayhani *et al.*, 2008). در طول دوره پرورش زیست سنجی هر دو هفته یکبار انجام گرفت. جهت کاهش اثرات استرس زای عملیات زیست سنجی، یک روز قبل از زیست سنجی غذادهی به ماهیان قطع گردید و از پودر گل میخک با دوز ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به عنوان ماده بیهوشی استفاده گردید. تمام ماهی‌ها از هر تکرار برای زیست سنجی انتخاب شدند و با

استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند و با خط کش ۱ میلی متری طول آن‌ها اندازه‌گیری شد (Tuan and Williams, 2007 ،Ghiasvand *et al*., 2015).

با توجه به مقادیر طول و وزن ماهیان در زیست سنجی‌های انجام شده، برای بررسی روند رشد ماهیان در تیمارهای مختلف از شاخص‌های رشد استفاده گردید که بر اساس روش‌های (Piaxo *et al*., 2020) محاسبه گردید.

پیش از آغاز دوره غذادهی نیز مقدار مواد مغذی موجود در جیره شامل چربی، پروتئین، خاکستر و رطوبت به ترتیب با استفاده از روش سوکسله، روش کجلدال الکتریکی و آون طبق روش استاندارد C محاسبه گردیدند (AOAC, 2000).

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این تحقیق در قالب یک طرح کاملا تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. کلیه داده‌های جمع آوری شده در هر مرحله در نرم‌افزار اکسل ثبت گردید و مورد بررسی اولیه قرار گرفتند و پس از محاسبه میانگین داده‌ها از طریق این نرم افزار، داده‌ها به نرم‌افزار Spss نسخه ۲۲ منتقل گردیدند. در گام نخست نرمال بودن پراکنش داده ها با استفاده از آزمون Kolomogrov-Smirnov مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One- way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تکرارها استفاده گردید.

۳. نتایج

نتایج مربوط به زنده مانی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در سه حالت آزاد، ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و ریزپو شانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان در طی ۱۲۰ دقیقه قرارگیری در شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- نتایج مربوط به زنده مانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

زمان (دقیقه) پروبیوتیک	صفر	۶۰	۱۲۰
باکتری ریزپوشانی نشده	$۱/۳±۰/۰۴×۱۰^{۸\ Aa}$	$۱/۲۳±۰/۰۵×۱۰^{۸\ Bab}$	$۱/۰۷±۰/۴۴×۱۰^{۸\ Bb}$
باکتری ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم	$۱/۱۵±۰/۱۶×۱۰^{۸\ Bb}$	$۱/۲۱±۰/۱۱×۱۰^{۸\ Bb}$	$۱/۳۸±۰/۲۲×۱۰^{۸\ Aa}$
باکتری ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان	$۱/۲۶±۰/۱۴×۱۰^{۸ABb}$	$۱/۴۲±۰/۱۷×۱۰^{۸\ Aa}$	$۱/۴۸±۰/۰۸×۱۰^{۸Aa}$

حروف کوچک لاتین غیر همنام بر روی انحراف معیار به معنای وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف است و حروف بزرگ لاتین غیر همنام بر روی انحراف معیار به معنای وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون است.

همانگونه که مشاهده می‌شود، ریزپوشانی به طو معناداری موجب افزایش زنده مانی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با تیمار شاهد گردید ($p<۰/۰۵$).

در طول دوره آزمایش هیچگونه تلفاتی در بین هیچ یک از تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید اما ماهی‌های مربوط به تیمارهای مختلف از لحاظ برخی از فاکتورهای رشد با یکدیگر اختلافات معنی‌داری را نشان دادند. بیشترین میزان رشد روزانه، افزایش وزن و درصد افزایش وزن در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *L. rhamnosus* ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان (T_2) مشاهده شد که در مقایسه با ماهیان تیمار شاهد (T_5) دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$). نتایج محاسبات مربوط به فاکتور وضعیت (CF) در پایان دوره پرورش نشان داد که بین مقادیر آن در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری وجود ندارد ($P>۰/۰۵$). بیشترین

مقدار نرخ رشد ویژه وزنی (SGR) در تیمار (T_2) و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد (T_5) مشاهده شد ($P>0/05$). بیشترین مقدار ضریب تبدیل غذایی (FCR) در ماهیان تیمار شاهد (T_5) و کمترین مقادیر آن در ماهیان تیمار (T_2) مشاهده گردید که در این مورد نیز اختلاف غیر معنی‌دار بود ($P>0/05$). نتایج مربوط به بررسی شاخص‌های رشد، تغذیه و درصد بازماندگی تیمارهای مختلف در جدول (۳) ارائه گردیده است.

جدول ۳- میانگین (میانگین±انحراف معیار) شاخص‌های رشد در میان تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

تیمار / شاخص	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
وزن اولیه (g)	۵/۹۵±۰/۰۷	۶/۱۵±۰/۱۲	۶/۳۲±۰/۲۲	۶/۴۱±۰/۱	۶/۳۲±۰/۲۲
وزن نهایی (g)	۳۳/۶۱±۱/۲۳ b	۳۴/۹۵±۰/۸۸ a	۳۲/۷۴±۱/۴۶b	۳۲/۸۱±۱/۰۵b	۳۱/۵۵±۱/۳۶c
طول نهایی (cm)	۱۳/۵۹ ±۰/۱۸	۱۳/۷۷ ±۰/۲۳	۱۳/۴۸ ±۰/۱۱	۱۳/۵ ±۰/۳۱	۱۳/۲۸ ±۰/۱۴
میزان رشد روزانه (g)	۰/۴۶b	۰/۴۸a	۰/۴۴c	۰/۴۴c	۰/۴۲d
افزایش وزن (g)	۲۷/۶۶±۱/۱۷ b	۲۸/۸±۰/۶۳ a	۲۶/۴۲±۱/۱۶ c	۲۶/۴۰±۰/۸۸ c	۲۵/۲۳±۱/۲۵ d
درصد افزایش وزن بدن	۴۶۴/۵۲±۲۴/۵۶ a	۴۶۸/۳۷±۱۶/۶۳ a	۴۱۸/۴۳±۲۷/۶۷ b	۴۱۱/۱۱±۲۱/۳۸ b	۳۹۹/۸۰±۲۵/۷۷ b
نرخ رشد ویژه وزنی SGR	۲/۸۸±۰/۸۸	۲/۹۰±۱/۲۵	۲/۷۳±۱/۲۵	۲/۷۳±۰/۸۸	۲/۶۸±۱/۲۵
فاکتور وضعیت CF	۱/۳۳±۰/۱۹	۱/۳۳±۰/۰۸	۱/۳۳±۰/۱۴	۱/۳۳±۰/۱۱	۱/۳۴±۰/۱۵
ضریب تبدیل غذایی FCR	۱/۴۱±۰/۱۴	۱/۴۱±۰/۰۲	۱/۴۷±۰/۰۵	۱/۴۶±۰/۱۸	۱/۴۹±۰/۰۹
درصد بازماندگی	۱۰۰±۰/۰۰ a	۱۰۰±۰/۰۰ a	۱۰۰±۰/۰۰ a	۱۰۰±۰/۰۰ a	۱۰۰±۰/۰۰ a

حروف کوچک لاتین غیر همنام بر روی انحراف معیار به معنای وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف است

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر به منظور افزایش پایداری باکتری *L. rhamnosus* این باکتری‌ها به وسیله آلژینات سدیم و کیتوزان مورد ریزپوشانی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ریزپوشانی به طور معناداری موجب حفاظت از پروبیوتیک *L. rhamnosus* در برابر شرایط شبیه سازی شده معده قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و ماهیانی که در جیره غذایی آن‌ها از پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده با آلژینات و کیتوزان (T_2) استفاده شده بود، از لحاظ برخی از فاکتورهای رشد نسبت به ماهیان دیگر تیمارها در شرایط بهتری بودند. بیشترین میزان رشد روزانه و افزایش وزن مربوط به ماهیان تیمار (T_2) بود که با ماهیان تیمار شاهد (T_5) دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<0/05$). بیشترین میزان SGR و کمترین میزان FCR نیز در ماهیان تیمار (T_2) مشاهده گردید هرچند که با ماهیان تیمار شاهد (T_5) دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($P>0/05$). بازده ریزپوشانی در کپسول‌های آلژینات سدیم در مطالعه حاضر ۹۱٪ و در کپسول‌های آلژینات سدیم-کیتوزان ۸۷٪ محاسبه گردید که این امر نشان از وجود دقت مناسب در انجام مراحل مختلف فرآیند ریزپوشانی می‌باشد. پتانسیل زتای کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و آلژینات سدیم-کیتوزان نیز به ترتیب ۳۲/۸ mv- و ۳۴/۳ mv- محاسبه گردید. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است چون نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیر متحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است و به همین دلیل بار ذرات اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شود. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک می‌شود که این امر در جلوگیری از آگلومره شدن ذرات و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم نقش اساسی ایفا می‌نماید

(Peinado *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر تاثیر شرایط شبیه سازی شده معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر روی زنده مانی پروبیوتیک‌های آزاد و ریزپوشانی شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ریزپوشانی می‌تواند پروبیوتیک *L. rhamnosus* را به طور موفقیت آمیزی در برابر شرایط دستگاه گوارش ماهیان قزل‌آلای انگشت قد محافظت نمایند که با نتایج حاصل از مطالعات Hosseini و همکاران (2016)، Hansen و همکاران (2002)، Panigrahi و همکاران (2004) و Cordero و همکاران (2015) در مورد اثر مثبت ریزپوشانی بر زنده مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش آبزیان مطابقت دارد. Pinpimai و همکاران (2015) پس از قراردادن مخمر *Sacaromyces cerevisea* ریزپوشانی شده و آزاد در شرایط شبیه سازی روده و دستگاه گوارش ماهی تیلاپیا *O. niloticus* مشاهده نمودند که گونه‌های ریزپوشانی نشده، درصد زنده‌مانی کمتری داشتند و از لحاظ ریخت شناسی دچار تغییراتی از قبیل زبر شدن، ناهمواری و تخریب در قسمت‌های سطحی خود گردیده بودند اما میزان زنده مانی پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش ماهی بیشتر بود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. Zhao و همکاران (2012) توانایی یک تکنیک ریزپوشانی برای محافظت از پروبیوتیک *Lactobacillus reuteri* در هنگام عبور از شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش را مورد مطالعه قرار دادند و ویژگی‌های عملکردی پروبیوتیک مورد نظر را بررسی کردند. آن‌ها علاوه بر اینکه هیچگونه کاهشی در ویژگی های عملکردی پروبیوتیک مانند سینتیک رشد، توانایی چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال روده و توانایی محدود سازی اتصال باکتری *Escherichia coli* به سلول‌های اپیتلیال روده مشاهده نکردند، دریافتند که خاصیت باکتری‌کشی و باکتریو استاتیکی پروبیوتیک‌های بازیابی شده در مقابل عوامل بیماری‌زا در مقایسه با پروبیوتیک‌های آزاد اولیه به طور معناداری بیشتر بود.

یافته‌های حاصل از این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعات سایر محققان در مورد اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر عملکرد رشد در آبزیان مطابقت دارد (Ullah *et al.*, 2018, Pinpimai *et al.*, 2015, Mohapatra *et al.*, 2012). Pirarat و همکاران (2015) با مطالعه زنده مانی و ارزیابی ریخت شناسی پروبیوتیک *L. rhamnosus* ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم در ماهیان تیلاپیا *O. niloticus* دریافتند که ریزپوشانی باعث افزایش زنده مانی پروبیوتیک و در نهایت افزایش رشد و بقاء ماهی تیلاپیا می‌گردد. اثرات مثبت ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با ترکیباتی مانند آلژینات کلسیم و آلژینات- شیر بر نرخ رشد، در مطالعات Rosas-Ledesma و همکاران (2012) بر روی ماهیان *Sole senegalese* و Cordero و همکاران (2015) بر روی ماهیان Gilthead seabream نیز به اثبات رسیده است. Hooshyar و همکاران (2020) با مطالعه بر روی *L. rhamnosus* ریزپوشانی شده با آلژینات و نشاسته ذرت در جیره غذایی ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان شاهد بهبود شاخص‌های رشد مانند افزایش وزن و FCR در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده در مقایسه با تیمار شاهد بودند. Pinpimai و همکاران (2015) پس از افزودن مخمر *S. cerevisea* ریزپوشانی شده و گونه‌های فاقد کپسول به جیره غذایی ماهیان تیلاپیا *O. niloticus* فعالیت ضد میکروبی مخمر و کارایی رشد ماهیان تیلاپیا را بررسی‌کردند و به این نتیجه رسیدند که ماهیانی که در جیره غذایی آن‌ها از مخمرهای ریزپوشانی شده استفاده شده بود، در مقایسه با ماهیانی که جیره غذایی آن‌ها حاوی مخمرهای فاقد کپسول بود از میزان رشد بهتری برخوردار بودند. Ghosh و همکاران (2016) با ریزپوشانی پروبیوتیک *Enterobacter* C6-6 با آلژینات دریافتند که ریزپوشانی نه تنها موجب کاهش توان پروبیوتیکی *Enterobacter* C6-6 نگردید، بلکه استفاده از آن در جیره غذایی لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب کاهش مرگ و میر در اثر مواجهه با عامل بیماری‌زای *Flavobacterium psychrophilum* نیز گردید.

همچنین بررسی توان پروبیوتیکی باکتری *Lactobacillus bulgaricus* ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان در فیل ماهیان جوان Huso huso نیز نشان داد که پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده نسبت به پروبیوتیک‌های گروه شاهد که فاقد کپسول بودند با درصد زنده‌مانی بیشتری به روده ماهیان رسیدند و ماهیانی که به جیره غذایی آنها پروبیوتیک‌های ریزپوشانی شده افزوده شده بود نسبت به ماهیان گروه شاهد از رشد بیشتری برخوردار بودند (Hosseini *et al.*, 2018). وجود ترکیباتی مانند آلژینات ها، کیتوزان، گزانتان، ژلان، کاراجینان، ژلاتین، سلولز و غیره در ساخت کپسول برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها، خود می‌تواند در نقش سین بیوتیک عمل نماید. تاثیر سین بیوتیک‌ها در افزایش رشد آبزیان نیز پیش از این به اثبات رسیده است. برای مثال Cavalcante و همکاران (2020) گزارش دادند که افزودن سین بیوتیک کیتوزان-الیگوساکارید مانان و مجموعه‌ای از باکتری‌های پروبیوتیکی *Bifidobacterium* sp, *L. acidophilus* و *Enterococcus faecium* موجب بهبود شاخص‌های رشد در ماهی تیلاپیای نیل (*O.niloticus*) می‌گردد. با اینحال Gonzalez و همکاران (2018) بیان نمودند که پس از افزودن نوعی پری‌بیوتیک حاصل از تخمیر محصولات لبنی با مخمر آبجو (با نام تجاری Growbiotic A) و گروهی از باسیلوس‌های غیر بیماری‌زا و دارای خاصیت پروبیوتیکی (با نام تجاری Aquablend) به عنوان پروبیوتیک با تراکم 10^9 CFU/kg به جیره غذایی ماهیان *Totoaba macdonaldi* با وزن اولیه ۳۱۵ گرم، هیچ تفاوت معناداری در رشد و بقا مشاهده نشد. از جمله دلایلی که Gonzalez و همکاران برای عدم تاثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر رشد برشمردند، وزن بالای ماهیان بود چرا که ماهیان جوان‌تر با سرعت رشد و جذب مواد غذایی بالاتر، اثر تیمارهای غذایی مختلف را بهتر نمایان می‌کنند. از طرفی Hauville و همکاران (2016) با تحقیق روی لارو ماهیان *Symphodus ocellatus* تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک گزارش دادند که هیچ بهبود رشدی در لاروها مشاهده نشد. بنابراین با بررسی و مقایسه نتایج حاصل از دو مطالعه اخیر این فرضیه تقویت می شود که وزن تنها عامل دخیل بر عدم اثرگذاری مثبت پروبیوتیک‌ها بر رشد نبوده است و احتمالا تعداد پروبیوتیک‌هایی که به صورت زنده از دستگاه گوارش میزبان عبور کرده‌اند و خود را به روده رسانده‌اند به اندازه‌ای نبوده است که اثرات مثبت خود را بر رشد نمایان کنند. چرا که لارو ماهیان کفشک که از طریق ریز پوشانی زیستی (Bioencapsulation) به وسیله روتیفرهای غنی سازی شده با پروبیوتیک‌های *L. plantarum, L. helveticus* و *S. Thermophiles* تغذیه شدند (Gatesoupe, 1991) یا لارو ماهیان *Pollachius pollachius* که با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک‌های *saccharomyces cerevisiae* تغذیه شدند (Gatesoupe, 2002) اثرات مثبتی بر رشد از خود به جای گذاشتند. البته به نظر می‌رسد که عوامل دیگری نیز مانند طول دوره پرورش (Ridha and Azad, 2012)، نوع پروبیوتیک و سازگاری با میزبان و پایداری و توان ایجاد کلنی در روده میزبان (Burr *et al.*, 2009) می‌توانند در بروز یا عدم بروز اثرات معنادار در رشد موثر باشند.

با این حال به منظور بررسی هریک از عوامل ذکر شده در توجیه عدم اثرگذاری پروبیوتیک‌ها در رشد، پیش از هر چیز می‌بایست از تراکم مناسب باکتری‌ها در روده میزبان اطمینان حاصل نمود. برای مثال Merrifield و همکاران (2010) گزارش دادند که زمانی که تعداد پروبیوتیک‌های افزوده شده به جیره غذایی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در حد ٪۶۲ باشد، هیچگونه افزایش رشد معناداری مشاهده نمی‌شود. اما با افزایش تراکم پروبیوتیک تا حد ٪۸۰، میزان SGR به طور معناداری افزایش پیدا کرد.

کپسول با محافظت از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایط محیطی مانند pH، شرایط کاهش- اکسایش و شرایط نامتعادل یونی موجب افزایش انتقال آنها به ناحیه هدف با بیشترین زنده‌مانی می‌گردد. ویژگی انتخابی مواد استفاده شده در ساخت کپسول مانند انحلال پذیری در یک دما و pH مشخص موجب ایجاد یک سیستم انتقال هوشمند

می‌گردد که یک قسمت خاص از بدن میزبان را مورد هدف قرار می‌دهد و موجب افزایش دسترسی ایمنی به پروبیوتیک و افزایش جذب آن‌ها در بافت هدف می‌شود که خود به کاهش میزان استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی و افزایش کارایی رشد و درمان منجر می‌گردد (Masoomi dezfooli *et al.*, 2018). نتایج این مطالعه به خوبی نشان داد که استفاده از تکنیک ریزپوشانی برای پروبیوتیک *L. rhamnosus* با کمک به افزایش پایداری و زنده مانی پروبیوتیک موجب بهبود فاکتورهای رشد در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید و این تاثیر بیشتر در تیمار آلژینات-کیتوزان (T_2) مشاهده گردید. بنابراین، استفاده از تکنیک یا روش ریزپوشانی به منظور افزایش زنده مانی پروبیوتیک‌ها و تاثیرگذاری مثبت بر رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را توصیه می‌نماید و این امید می‌رود که با استفاده از این کپسول‌های پروبیوتیکی در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای کشور، بتوان نقش مثبتی را در افزایش رشد ماهیان داشت و به عنوان یک روش ساده، ارزان و سازگار با محیط زیست به افزایش تولید ماهیان در مزارع پرورشی کشور کمک شایان توجهی نمود.

۴.۱. نتیجه گیری کلی

یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی صنعت ریزپوشانی پیچیدگی‌های تبدیل آن از مقیاس آزمایشگاهی به صنعتی و اثرات آن بر خواص حسی غذا است که نیاز به بحث و تحقیقات گسترده دارد. چرا که دانش استفاده از روش‌های ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری بسیار نوپا ست و مطالعات اندکی تا کنون در این زمینه صورت گرفته است. به همین دلیل لازم است پژوهش‌های بیشتری به منظور تعیین مکانیسم یا فرایند عمل میکروکپسول‌ها و تاثیر متقابل آن‌ها بر یکدیگر، تاثیر آنزیم‌های مختلف دستگاه گوارش بر ساختمان و عملکرد میکروکپسول‌ها، نقش میکروبیوتای روده در سلامتی آبزیان، بکارگیری فناوری‌های جدید برای ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها و استفاده از مواد زیستی محافظ و محرک رشد برای پروبیوتیک‌ها صورت گیرد، به گونه‌ای که بر یکدیگر اثر هم افزایی داشته باشند.

۵. منابع

References

Adineh, H., Jafaryan, H., Sahandi, J., Alizadeh, M., 2013. Effect of *Bacillus* spp. Probiotic on growth and feeding performance of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 16 (1), 29-36.

Ahmadivand, S., Behdaii, M., Soltani, M., 2015. Evaluation of the efficacy of oral DNA vaccine against viral pancreatic necrotic disease in trout (*O. mykiss*). Ph.d thesis. University of Tehran, Iran, Tehran. 76 P.

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

Bol, K. F., Aarntzen, E. H., Pots, J. M., Olde, N. M. A., van de Rakt, M. W., Scharenborg, N. M., de Boer, A. J., van Oorschot, T. G., Croockewit, S. A., Blokx, W. A., Oyen, W. J., Boerman, O. C., Mus, R. D., van Rossum, M. M., van der Graaf, C. A., Punt, C. J., Adema, G. J., Figdor, C. G., de Vries, I. J., Schreibelt, G., 2016. Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65 (3), 327–39.

Borgeson, L., Tracy, M., 2005. Effect of Replacing Fish Meal with Simpleor Complex Mixtures of Vegetable Ingredients in Diets Fed to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Agriculture Nutrition* 12(2), 141-149.

Burr, G., Gatlin, D. M., Hume, M., 2009. Effects of the prebiotics GroBiotic®-A and inulin on the intestinal microbiota of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of World Aquaculture Society* 40(4), 440–449.

Cavalcante, R. B., Telli, G. S., Tachibana, L., Dias, D. C. Oshiro, E., [b]Natori, M. M., daSilva, W. F., Ranzani-Paiva, M. J., 2020 . Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports* 17(7), 1-8.

Chandramouli, V., Kailasapath, K., Peiris, P., Jones. M., 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods* 56(1), 27–35.

Chen, Y., Hua, X., Ren, X., Duan, K., Gao, S., Sun, J., Feng, Y., Zhou, Y., Guan, X., Li, D., Wang, N., Li, J., Yang, J., Xia, D., Shi, W., Liu, M., 2020. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* displayed AHA1CK6 and VP2 induces protection against infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 100(3), 18–26.

Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapia-Paniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C. 2015. Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 45(2), 608–618.

Duan, K., Hua, X., Wang, Y., Wang, Y., Chen, Y., Shi, W., Li, Y., Liu, M., 2018. Oral immunization with a recombinant Lactobacillus expressing CK6 fused with VP2 protein against IPNV in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 83(9), 223-231.

FAO (Food and Agriculture Organization)., 2011. Statistic Annual.

FAO., 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture, FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 154P.

Gatesoupe, F. J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis* and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96(3-4), 335–342.

Gatesoupe, F.J., 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212(1-4), 347–360.

Ghiasvand, Z., Ahmadi, Z., Allameh, M., Changizi, R., 2015. Effect of different Levels of Dietary Vitamin C (Ascorbic Acid) On Growth, Nutrition, Survival and some Immunological and Hematological parameters of Tinfoil Barb (*Barbonymus schwanenfeldii*). *Journal of Animal Researches* 29(3), 318-326.

Ghosh, B., Cain, K. D., Nowak, B. F., Bridle, A. R., 2016. Microencapsulation of a putative probiotic Enterobacter species C6-6, to protect rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against bacterial coldwater disease. *Journal of Fish Diseases* 39(1), 1–11.

Gonzalez, F, M, L., Gatlin, D. M., Urquidez, B. P., Ree Rodríguez, C, D. L., Duarte, R, L., Sanchez, F., Casas, R. A., Yamamoto, F. Y., Ochoa, L. A., Perez, V. M., 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 491(3), 239-251.

Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., Paulson, A. T., 2002. Survival of Caalginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food microbiology* 19(1), 35-45.

Hauville, M. R., Zambonino-Infante, J. L., Bell, J. G., Migaud, H., Main, K.L., 2016. Effects of a mix of Bacillus sp. as a potential probiotic for Florida pompano, common Snook and red drum larvae performances and digestive activities. *Aquaculture Nutrition* 22(1), 51–60.

Hooshyar, Y., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., Gandomi, H., 2020. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on Different Parameters Related to Health Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the Protection Against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12(4), 1370-1384.

Hosseini, A.,Chaharlang, F., Sotoudeh, E., Alishahi, M., Modaresi, M., 2016. The effect of isolated Lactobacillus from gut of *Barbus grypus* on growth performance, survival and gut microflora of common carp (*Cyprinus carpio*)**.** *Iranian Scientific Fisheries Journal* 25(3), 167-180.

Hosseini, S. S., Mohammadian, T., Abbaspour, M. R., Alishahi, M., 2018. The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum)* in the simulated condition of stomach and intestines in *Huso huso. Iranian Scientific Fisheries Journal* 27(2), 161-172.

Kailasapathy, K., 2008. Formulation, administration and delivery of probiotics Therapeutic Microbiology. *American Society of Microbiology* 27(2), 97-118.

Kong, Y., Gao, C., Du, X., Zhao, J., Li, M., Shan, X., Wang, G., 2020. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*). *Fish and Shellfish Immunology* 102(7), 412-421.

Masoomi dezfooli, S., Noemi, G., Andrea, A., Ali, S., 2018. Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. *Reviwes in Aquacultur* 11(3). 1-30.

Merrifield, D. L., Harper, G. M., Dimitroglou, A., Ringo, E., Davies, S. J., 2010. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research* 41(8), 1268–1272.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A., Das, P., Paniprasad, K., Mohanta, K., 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition* 18(1), 1–11.

Mortazavian, A., Seyed Hadi, R., Mohammad Reza, E., Sara, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of Probiotic microorganisms. *Iranian Journal of biotechnology* 5(1), 1-18.

Nayak, S. K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunol* 29(1), 2-14.

Nikoskelainen, S., Arthur, C., Goran, B., Seppo, S., Essa, M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shelfish Immunology* 15(5), 443-452.

Olafsen, J., 2001. Interaction between fish larvae and bacteria in marine Aquaculture. *Aquaculture* 200(8), 223 – 247.

Oliana, C., Luisa, D., Roberto, S., Giorgia, G., Ike, O., Stefania, S., Alberto, C., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258(1-4), 430-438.

Paixao, P. E. G., do Couto, M. V. S., Sousa, N. C., Abe, H. A., Reis R. G. A., Dias, J. A. R., Meneses, J. O., Cunha, F. S., Santos, T. B. R., da SilvaI. C. A., Medeiros, E. D. S., Fujimoto, R. Y., 2020. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture* 562(4), 1-7.

Panigrahi, A. Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H., 2004. Immune response in rainbow trout (*O. mykiss*) induced by potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102(4), 379-388.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykis* (Walbaum). *Fish Physiology. Biochemical* 36(4), 969–977.

Peinado, I., Lesmes, U., Andres, A., McClements, J. D., 2010. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. *Langmuir* 26(12), 9827-9834.

Peredo, A. M., Buentello, A., Gatlin, D.M.I.I.I., Hume, M., 2015. Evaluation of a dairy yeast prebiotic in the diet of juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of World Aquaculture Society* 46(1), 92–101.

Pinpimai, K., Channarong, R., Nantarika, C., Takayuki, K., Masashi, M., Nopadon, P., 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccaromyces cerevisiae* JCM7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in veterinary science* 102(8), 103-111.

Pirarat, N., Komkiew, P., Channarong, R., Nantarika, Ch., Ei Lin, O., Takayuki, K., Masashi, M., 2015. Vaiability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against Streptococcus agalactiae. *Animal Feed Science and Technology* 207(9), 93-103.

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

Ridha, M. T., Azad, I. S., 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research* 43(6), 843–852.

Rezaei Mokarram, R., Mortazavi, S. A., Habibi Najafi, M. B., Shahidi, F., Khomeiri, M., 2008. The influence of alginate microencapsulation on survivability of microencapsulated probiotic *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 in simulated gastric and intestinal juice. *Quarterly Journal of Food Science and Technology* 7(2), 1-24.

Rokka, S., Rantamaki, P., 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation. challenges for Industerial applications. *European food Research and Technology* 231(1), 1-12.

Rosas-Ledesma, P., Leon-Rubio, J. M., Alarcon, F. J. Morinigo, M. A., Balebona, M. C., 2012. Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research* 43(1), 106–116.

Sarmento, B., Ribeiro, A. J., Veiga, F., Ferreira, D. C., Neufeld, R. J., 2007. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 7 (8), 2833-2841.

Sheu, T. Y., Marshall, R. T., Heymann, H., 1993. Improving Survival of Culture Bacteria in Frozen Desserts by Microentrapment. *Journal of Dairy Science* 76(7), 1902-1907.

Sohail. A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B., 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* 145(1), 162–168.

Spkota, A., Sapkota, A. R., Kucharski, M., Burke, J., Mckenzie, S., Walker, P., Lawrence, R., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International* 34(8), 1215–1226.

Tahmasebi Kayhani, A., Keyvan Shokooh, S., Nematollahi, A., Mahmoudi, N. and Zanussi, H. P. (2008). Evaluation of dietary nucleotide function on growth indices and intestinal morphology of rainbow trout (*O. mykiss*). *Journal of Marine Science and Technology* 9(1), 45-54.

Tookmehchi, A., Shamsi, H., Meshkini, S., Delshad, R., Ghasemi Moghanjoei, A., 2012. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 21 (3), 13-22.

Tuan, L. A., Williams, K. C., 2007. Optimum dietary protein and lipid specification for juvenile Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture* 267(7), 129-138.

Ullah, A., Zuberi, A., Ahmad, M., Bashir, S. A., Younus, N., Ullah, S., 2018. Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (*Cirrhinus mrigala*) in a natural earthen polyculture system. *Fish and Shellfish Immunology* 72(1), 266–272.

Watson, A., Kaspar, H. M., Josie, L., Lewis, G., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274(1), 1–14.

Witte, W., Klare, I., Werner, G., 1999. selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection* 27(1), 35-38.

Yazici, I., Olcay, H., Sevdan, Y., Murat, Y., 2015. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*O. mykiss*) under sublethal water temperature. *Marine Science and Technology Bulletin* 4(2), 21-28.

Zhao, Q., Mutukumira, A., Lee, S. J., Maddox, I., Shu, Q., 2012. Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(1), 61-70.

Zilberg, D., Tal, A., Froyman, N., Abutbul, S., Dudai, N., Golan-Goldhirsh, A., 2010. Dried leaves of *osmarinus officinalis* as a treatment for streptococcosis in tilapia. *Journal of Fish Diseases* 33(4),361-369.

Zorrieh Zahra, S. J., Adel, M., 1395. Emerging and re-emerging viral diseases, major challenge facing the aquaculture industry. *19th Iranian Veterinary Congress*, Iran, Tehran, 5P.