



اثر باکتری *Lactobacillus plantarum* (KC426951) جداسازی شده از روده قزل آلائی رنگین کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

افشین قلجایی فرد^{۱*}، حسین خارا^۲، علیرضا شناور ماسوله^۳

^{۱*} - دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان

^۲ - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان

^۳ - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت

پذیرش: ۹۳/۱۱/۰۱

دریافت: ۹۳/۰۵/۰۴

*نویسنده مسئول مقاله: a78fard@gmail.com

چکیده:

تحقیق حاضر به منظور ارزیابی تاثیر باکتری اسید لاکتیک *Lactobacillus plantarum* (KC426951) جداسازی شده از روده قزل آلائی رنگین کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده، ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن $3/56 \pm 2/24$ گرم به مدت ۲ هفته با شرایط پرورشی محیطی سازگار شدند. پنج گروه از ماهیان با جیره حاوی 10^6 (تیمار ۱)، 10^7 (تیمار ۲)، 10^8 (تیمار ۳)، 10^9 (تیمار ۴) و 10^{10} (تیمار ۵) cfu g^{-1} لاکتو باسیلوس پلانتاروم و گروه کنترل (شاهد) بدون جیره حاوی پروبیوتیک به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که میزان وزن نهایی، طول نهایی، ضریب رشد، درصد افزایش وزن در تیمار ۲ بیشترین و در تیمار ۵ کمترین مقدار و میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۲ کمترین و در تیمار ۵ بیشترین را به خود اختصاص داده بودند ($P < 0/05$). بالاترین تعداد باکتری های اسید لاکتیک روده ماهیان قزل آلا در تیمار ۴ و در حالیکه کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد ($P < 0/05$) بدست آمد. حداکثر پروتئین لاشه در تیمار ۴ و حداقل چربی لاشه در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). باتوجه به نتایج بدست آمده در خصوص بکارگیری *Lactobacillus plantarum* می توان از آن به عنوان یک فاکتور مثبت جهت بهبود فلور باکتریایی روده، عملکرد رشد و ترکیب لاشه استفاده نمود.

کلید واژگان: قزل آلائی رنگین کمان، *Lactobacillus plantarum*، رشد، فلور باکتریایی روده، لاشه

مقدمه

ماهی قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گونه ايي با ارزش تجاري بالا مي باشد و بيماري هاي عفوني باکتريايي در بسياري از مزارع پرورشي يکي از دلايل عمده کاهش ميزان توليد مي باشد (Gosh et al., 2002). يکي از معمول ترين روش هاي در مان اين عفونت ها ، استفاده از آنتي بيوتیک ها مي باشد اين در حالي است که استفاده بيش از حد از اين داروها باعث بروز مقاومت باکتريايي در اين حيوانات مي شود (Tuber, 2001).

استفاده از آنتي بيوتیک ها و مواد شيميايي براي برطرف نمودن مشکلات آبري پروري علاوه بر دارا بودن اثرات حاشيه اي و هزينه بالا موجب انباشتگی مواد شيميايي در محيط و ماهي مي شود (Sealy and Gatlin, 2001). امروزه پروبيوتیک ها با مکمل هاي ميكروبي در مقابل آنتي بيوتیک ها قرار مي گيرند . پروبيوتیک ها ميكرو ارگانيسم هاي مکملی نظير باکتری ها ، قارچ ها و مخمرها مي باشند که با متعادل نمودن فلور ميكروبي دستگاه گوارش ، سلامت ميزبان را افزايش مي دهند (Fuller, 1992). بر اساس تعريف Douliet و Longdon (1994) پروبيوتیک ها غذاهاي کمکی اند که آنزيم هاي جانبي آن ها مي تواند باعث افزايش فرايند هضم شود . اين ميكرو ارگانيسم ها نه تنها باعث کاهش ميكروب هاي بيماري زا در محيط و موجود زنده مي شوند ، بلکه با ايجاد و تقويت ميكرو ارگانيسم هاي مفيد موجود در دستگاه گوارش ، موجبات سلامتي و يا افزايش ميزان رشد را در موجودات زنده فراهم مي آورند (Fuller, 1992).

پروبيوتیک ها به روش هاي مختلفي از قبيل رقابت انحصاري با باکتری هاي پاتوژن (Vine et al., 2004a) ،

مشارکت در فعاليت هاي آنزيمي و غذايي براي گوارش (Garriques and Arevalo, 1995) ، مثلاً در ماهي ها ، باکتری هاي *Bacteroides* و *Closteridium Sp.* با ذخيره اسيد چرب و ويتامين ها به تغذيه ميزبان کمک مي کنند (Rorvik et al., 1991). به علاوه بعضي باکتری ها در دوکفه اي ها و قزل آلا با توليد آنزيم هايي مانند پروتازها و لپازها به هضم مواد غذايي (Priour et al., 1990) و تعادل ميكروبي فلور روده کمک مي کنند (Verschuere et al., 2000).

در سالهاي اخير مطالعات زيادي در آبري پروري در راستاي استفاده از باکترهاي اسيد لاکتيک جهت نيل به اهداف گوناگون نظير بهبود و تعادل فلور ميكروبي دستگاه گوارش ماهي، بهبود رشد و ضريب تبديل غذايي انجام شده است (Nikoskelainen et al., 2003) (Irianto et al., 2002). Kim & Austin (۲۰۰۶) با باکتری *C. maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens* B33 را از روده قزل آلاي رنگين کمان سالم جدا کردند و بعنوان پروبيوتیک استفاده نمودند. در پايان دوره آزمايش مشاهده نمودند پروبيوتیک مذکور اثرات مثبتی بر روی فاکتورهاي رشد داشته است. Merrifield و همکاران (۲۰۰۹)، اثرات *Pediococcus acidilactici* را بر رشد، بهره برداري از غذا، تشكيل کلنی در روده و پارامترهاي سلامت ماهي قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزيابي قرار دادند و پيشرفت معنی داری در عملکرد رشد، بهره برداري از غذا يا ترکيب لاشه در گروه استفاده نموده از پروبيوتیک در مقايسه با گروه شاهد، مشاهده نشد. اما کاهش معنی داری در فاکتور وضعيت (K) در ماهيان تغذيه نموده از پروبيوتیک دیده شد. اين مطالعه نشان داد که پتانسيلهايي براي استفاده از *P. acidilactici* در غذاي ماهي قزل آلاي رنگين کمان وجود دارد اما بايد تحقيقاتي جهت

استفاده بهینه از آن، صورت گیرد. Karimzadeh (۲۰۰۹) تحقیقاتی در زمینه اثرات سطوح مختلف باکتری به عنوان پروبیوتیک روی شاخصهای رشد، نرخ بازماندگی، وضعیت شیمیایی آنالیز لاشه در قزل آلی رنگین کمان انجام داد و نتایج این تحقیق نشان داد که ضریب تبدیل غذایی بطور معنی داری کاهش یافت و نرخ رشد در تیمارهای پروبیوتیکی اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشته و بمراتب بیشتر از آنها بوده است. Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) از باکتری پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی در جیره تیلاپای قرمز (*Oreochromis niloticus*) استفاده کردند و در نهایت مشاهده شد که این باکتری فاکتورهای رشد را بهبود بخشید. Panigrahi و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۰۴)، اثر *Lactobacillus rhamnosus* JEM 1136 را بصورت مکمل غذایی بر پاسخ های ایمنی و ترکیب فلور روده ماهی قزل آلی رنگین کمان بررسی کردند که بهبود فلور باکتریایی روده را نشان می دهد. استفاده از مخمر به عنوان پروبیوتیک در جیره فیل ماهی (*Huso huso*) نشان داد که فاکتورهای رشد در این ماهی بهبود معنی داری پیدا کرد (Askarian et al., 2011).

با توجه به مطالب بالا می توان گفت، تاکنون در زمینه افزودن باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بومی به جیره غذایی قزل آلی رنگین کمان، بویژه در سن رشد (بچه ماهی) جهت پرورش آنها در مزارع پرورش، مطالعه علمی و عملی و نیز بررسی اثر غذای حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم روی فلور باکتریایی روده و ترکیبات شیمیایی لاشه ی قزل آلی رنگین کمان به انجام نرسیده است.

هدف از تحقیق حاضر بررسی سطوح مختلف باکتری *Lactobacillus plantarum* در جیره غذایی روی برخی فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی

لاشه قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی ۶۰ روز می باشد تا بتوان گامی در راستای افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل و بهبود فلور باکتریایی روده با استفاده از پروبیوتیک بومی (رفع عدم نیازمندی به واردات پروبیوتیک) و به تبع آن کاهش هزینه ها و افزایش سود جهت پرورش این ماهی ارزشمند برداشت.

مواد و روش ها

اجرای این تحقیق در کارگاه خصوصی پرورش ماهی سردابی قزل آلی اشکراب واقع در شهرستان سیاهکل در استان گیلان انجام شد. ابتدا ۱۰۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلی رنگین کمان انتخاب و جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH) به مدت دو هفته با غذای کنستانتتره متداول مورد استفاده برای تغذیه بچه ماهیان قزل آلا تغذیه گردیدند و پس از رقم بندی تعداد ۵۴۰ بچه ماهی قزل آلی رنگین کمان با میانگین وزنی $3/56 \pm 2/24$ گرم در ۶ کانال بطور مساوی در قالب ۶ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار ۳۰ ماهی) به مدت ۶۰ روز نگهداری گردید. آب ورودی از رودخانه و با دبی ۱ تا ۱/۵ لیتر در ثانیه همراه با هوادهی وارد هر کانال می شد.

فرآورده ی میکروبی مورد استفاده، باکتری *Lactobacillus plantarum* جداسازی شده توسط Shenavar masouleh (2012) از روده قزل آلی رنگین کمان استان گیلان می باشد که با روش مولکولی 16SrRNA مورد شناسایی و در NCBI مورد ثبت قرار گرفت (KC426951). پودر اولیه حاوی 10^{11} - 10^{12} از باکتری *Lactobacillus plantarum* می باشد.

به منظور تغذیه بچه ماهیان یک نوع غذای خشک پلت از شرکت چین با سایز های SFT2 (۳-۵ گرم)، SFT3 (۵-۱۰ گرم)، FFT1 (۱۰-۲۰ گرم)، FFT2 (۲۰-۳۰ گرم) و GFT1 (۳۰-۱۰۰ گرم) انتخاب گردید.

قابل ذکر است که بیش از اجرای آزمایش، ارزش غذایی جیره خشک فوق از لحاظ سطوح چربی، پروتئین و رطوبت مورد سنجش قرار گرفت که به ترتیب شامل مقادیر ۱۴٪، ۴۰٪ و ۱۱٪ بود. برای آماده سازی جیره های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مقدار پروبیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار توسط ترازوی حساس (METLER مدل AB204-N) وزن شده و مطابق روش مورد استفاده Merrifield و همکاران (2011)، به پروبیوتیک سرم فیزیولوژی اضافه شد، که با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت های مختلفی از این باکتری از دوزهای $10^6 - 10^{10}$ CFU بر گرم غذا تهیه گردید. سپس روی غذا اسپری گردید. در ضمن به جیره ماهیان سه تکرار تیمار شاهد (۶)، غذای پلت اسپری شده با سرم فیزیولوژی خورانده شد (جدول ۱). کلیه ی غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار داده شد تا سرم مخلوط شده با غذا تبخیر گردد. پس از تبخیر، غذا را دوباره وزن نموده تا به وزن اولیه برسد سپس همه ی غذاها برای غذا دهی استفاده گردید.

میزان کل غذای مورد نیاز برای کلیه تیمارها بر اساس نتایج حاصل از زیست سنجی بچه ماهیان (هر ۱۵ روز یکبار) در هریک از تیمار تکرارهای پرورش، با در نظر گرفتن میانگین دمای آب و بر اساس جدول استاندارد (Farzanfar, 1993) در نظر گرفته شد. دفعات غذایی روزانه برای ماهیان تحت آزمایش طبق معادله زیر محاسبه شد (Timmons et al., 2006). معادله:

$$\frac{\sqrt{W}}{T^{1/4}} \times 40 = \text{تناوب غذایی روزانه (بر حسب ساعت)}$$

W = وزن بدن (گرم) T = دما (درجه سانتی گراد)

شاخص های رشد: جهت بررسی تاثیر باکتری *L.p* بر چگونگی رشد بچه ماهیان قزل آلا هر دو هفته یکبار اقدام به انجام زیست سنجی گردید. میانگین طول کل ماهی های هر تکرار مورد اندازه گیری قرار گرفت. میانگین وزن کل هر تکرار نیز مبنای محاسبه ی غذای مصرفی در هفته قرار گرفت. کلیه ی شاخص های بیولوژی بر اساس مدل های ارائه شده توسط Shepherd & Bromage (1992) انجام شد.

$$CF = \frac{W}{TL^3} \times 100 \quad (\text{شاخص وضعیت}) \quad W = \text{وزن (گرم)} \quad TL = \text{طول کل (سانتی متر)}$$

$$PBWI = \frac{BW_F - BW_I}{BW_I} \times 100 \quad (\text{٪ افزایش بدن})$$

BW_F = وزن نهایی (گرم) BW_I = وزن اولیه بدن (گرم)

$$FCR = \frac{F}{W_f - W_i} \quad (\text{ضریب تبدیل غذایی}) \quad F = \text{مقدار غذای مصرف شده} \quad W_f = \text{وزن نهایی (گرم)} \quad W_i = \text{وزن اولیه بدن (گرم)}$$

$$SGR = \frac{\ln W_F - \ln W_I}{t} \times 100 \quad (\text{شاخص رشد ویژه})$$

$\ln W_f$ = لگاریتم طبیعی وزن نهایی (گرم) $\ln W_i$ = لگاریتم طبیعی وزن اولیه (گرم) t = طول دوره پرورش بر حسب روز

$$ADG (g / fish / day) (\%) = \left[\frac{W_t - W_i}{W_i \times T} \right] \times 100$$

W_t = وزن اولیه ماهی W_i = وزن نهایی ماهی T = طول مدت پرورش

فلور باکتریایی: در پایان دوره ۶۰ روزه پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۵ عدد از ماهی های هر تکرار به طور تصادفی صید گردید، مراحل بیهوشی توسط تریکائین متان سولفونات (MS₂₂₂) (pH:7)

، با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (Raida et al., 2003) اسید لاکتیک و توتال کانت از روده بچه ماهیان قزل آلا از انجام شد ، سپس برای جداسازی و شمارش باکتریهای روش Merrifield و همکاران (2011) استفاده گردید.

جدول ۱ جیره های آزمایشی مورد استفاده جهت تغذیه بچه ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار	جیره
تیمار ۱	۱۰mg/10 Kg food از دوز 10^6 CFU باکتری بر گرم غذا
تیمار ۲	۱۰۰mg/10 Kg food از دوز 10^7 CFU باکتری بر گرم غذا
تیمار ۳	۱۰۰۰mg/10 Kg food از دوز 10^8 CFU باکتری بر گرم غذا
تیمار ۴	۱۰۰۰۰mg/10 Kg food از دوز 10^9 CFU باکتری بر گرم غذا
تیمار ۵	۱۰۰۰۰۰mg/10 Kg food از دوز 10^{10} CFU باکتری بر گرم غذا
شاهد	غذای خشک پلت + سرم فیزیولوژی

۳/۳۰±۱۷ درجه سانتیگراد ، ۴۳/۵±۸/۵ میلی گرم بر لیتر و ۲۶/۴±۷/۴ اندازه گیری شد .

شاخص های رشد : در پایان دوره پرورش ، عملیات زیست سنجی انجام و طی آن طول کل و وزن کلیه ماهیان اندازه گیری شد . بچه ماهیان در تیمار ۲ بیشترین وزن نهایی ، طول نهایی و بالا ترین ضریب رشد ویژه ، درصد افزایش وزن را دارا بودند ، مطالعات آماری انجام شده نشان داد که بین تیمارهای مذکور اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($P \leq 0/05$) (جدول ۲). همچنین تیمار ۵ کمترین وزن نهایی ، طول نهایی ، ضریب رشد ویژه ، درصد افزایش وزن را به خود اختصاص داد ($P \leq 0/05$) (جدول ۲) . کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی متعلق به تیمار ۲ و بیشترین مقدار آن متعلق به تیمار ۵ بود ($P \leq 0/05$) (جدول ۲) .

فلور باکتریایی روده : در پایان ۶۰ روز و پس از نمونه برداری از روده بچه ماهیان ، حداکثر میزان باکتری اسید لاکتیک *L.p* متعلق به تیمار ۴ و حداقل میزان آن متعلق به تیمار شاهد می باشد و بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P \leq 0/05$) (جدول ۳). همچنین

همچنین در پایان دوره آزمایش از هر تکرار ۵ قطعه بچه ماهی جهت آنالیز لاشه نمونه برداری شد و میزان پروتئین به روش ماکروکجلدال ، چربی به روش سوکسله ، خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی با حرارت 550 ± 25 درجه سانتی گراد و رطوبت با استفاده از اتوو برقی با درجه حرارت 103 ± 2 درجه سانتی گراد اندازه گیری شد (Majedi, 1997).

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی (Completery Randomyzed Design) و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و تست (Tukey) به عنوان Post Hoc ، جهت مقایسه میانگین ها مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت . اختلافات بین میانگین ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $p < 0/05$ تعیین گردید . کلیه عملیات مربوط به وسیله نرم افزار SPSS17 مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

درجه حرارت آب ، اکسیژن محلول در آب و pH آب بطور روزانه ثبت شد ، که بطور میانگین به ترتیب

بیشترین میانگین میزان توتال کانت باکتریایی متعلق به تیمار ۱ و کمترین میزان توتال کانت باکتریایی متعلق به تیمار ۵ می باشد ($P \leq 0/05$) (جدول ۳).
تجزیه لاشه: بیشترین درصد پروتئین لاشه در انتهای دوره آزمایش متعلق به تیمار ۴، همچنین تیمار ۱ کمترین درصد پروتئین لاشه را به خود اختصاص داده بود ($P \leq 0/05$)
 (جدول ۴). تیمار ۲ دارای بیشترین درصد چربی و تیمار شاهد کمترین درصد چربی را دارا بودند ($P \leq 0/05$) (جدول ۴). میزان رطوبت لاشه متعلق به تیمار ۳ و کمترین آن متعلق به تیمار ۴ بود ($P \leq 0/05$) (جدول ۴). بین تیمارهای مورد بررسی از نظر درصد خاکستر لاشه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نمی گردد ($P \geq 0/05$) (جدول ۴)

جدول ۲ پارامترهای رشد به دست آمده در تیمارهای مختلف آزمایشی و شاهد

شاخص های رشد	وزن نهایی	طول نهایی	ضریب تبدیل	ضریب رشد	درصد افزایش
تیمارها	(گرم)	(سانتیمتر)	غذایی	ویژه	وزن
۱	$50/11 \pm 6/99^{cd}$	$17/33 \pm 0/82^c$	$0/63 \pm 0/04^{ab}$	$3/05 \pm 0/1^{bc}$	$522/7 \pm 38/8^{bc}$
۲	$53/25 \pm 6/15^d$	$17/34 \pm 0/72^c$	$0/59 \pm 0/07^a$	$3/14 \pm 0/2^c$	$563/8 \pm 82/1^c$
۳	$42/01 \pm 6/55^b$	$16/43 \pm 0/86^b$	$0/78 \pm 0/09^b$	$2/76 \pm 0/17^{ab}$	$423/7 \pm 52/8^{ab}$
۴	$45/04 \pm 6/25^{bc}$	$16/74 \pm 0/99^{bc}$	$0/72 \pm 0/07^{ab}$	$2/87 \pm 0/14^{bc}$	$460/5 \pm 48/9^{abc}$
۵	$34/38 \pm 4/7^a$	$15/41 \pm 0/63^a$	$1 \pm 0/07^c$	$2/42 \pm 0/08^a$	$328/3 \pm 21/1^a$
شاهد	$44/55 \pm 6/08^{bc}$	$16/39 \pm 0/82^b$	$0/73 \pm 0/06^{ab}$	$2/85 \pm 0/11^{bc}$	$455 \pm 38/8^{abc}$

*وجود حروف مشابه در هر ستون نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار ($P \geq 0/05$) می باشد.

جدول ۳ میزان باکتری های اسید لاکتیک و توتال کانت روده بچه ماهیان در تیمارهای مختلف آزمایشی و شاهد

فلور باکتریایی	باکتری اسید لاکتیک	توتال کانت باکتریایی
تیمارها	(Log CFU g ⁻¹)	(Log CFU g ⁻¹)
۱	$2/05 \pm 0/1^b$	$9/13 \pm 0/05^d$
۲	$2/36 \pm 0/1^c$	$9/11 \pm 0/1^d$
۳	$2/38 \pm 0/01^c$	$8/1 \pm 0/17^c$
۴	$2/59 \pm 0/11^d$	$7/1 \pm 0/15^b$
۵	$2/39 \pm 0/1^c$	$6/72 \pm 0/05^a$
شاهد	0 ± 0^a	$8/36 \pm 0/07^c$

*وجود حروف مشابه در هر ستون نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار ($P \geq 0/05$) می باشد.

جدول ۴ نتایج تجزیه لاشه بچه ماهیان در انتهای دوره آزمایش در تیمارهای مختلف آزمایشی و شاهد

ترکیب شیمیایی لاشه	رطوبت	پروتئین	چربی	خاکستر	
(% ماده تر)	(% ماده خشک)	(% ماده خشک)	(% ماده خشک)	(% ماده خشک)	تیمارها
۷۱/۱ ± ۰/۸۳ ^{ab}	۷۱/۳ ± ۰/۶۲ ^a	۱۷/۵ ± ۰/۷۱ ^a	۶/۷۵ ± ۰/۳۵ ^a		۱
۷۲/۶ ± ۰/۵۸ ^{bc}	۷۲/۲ ± ۰/۵۶ ^{ab}	۲۰/۵ ± ۰/۷۱ ^b	۷/۲۵ ± ۰/۳۵ ^a		۲
۷۳/۹ ± ۰/۲۸ ^c	۷۳/۹ ± ۰/۶۲ ^{bc}	۱۷ ± ۰ ^a	۷ ± ۰/۷۱ ^a		۳
۶۹/۳ ± ۰/۸۳ ^a	۷۴/۱۶ ± ۰/۳ ^c	۱۷/۵ ± ۰/۷۱ ^a	۶/۷۵ ± ۰/۳۵ ^a		۴
۷۳/۳۴ ± ۰/۶۲ ^{bc}	۷۲/۵۶ ± ۰/۰۸ ^{abc}	۱۶/۵ ± ۰/۷۱ ^a	۷/۷۵ ± ۰/۳۵ ^a	شاهد	۵
۷۳/۱ ± ۰/۱۴ ^{bc}	۷۲/۵۶ ± ۰/۰۸ ^{abc}	۱۵/۵ ± ۰/۷۱ ^a	۷/۶ ± ۰/۱۴ ^a		

*وجود حروف مشابه در هر ستون نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار ($P \geq 0.05$) می باشد.

بحث و نتیجه گیری

فاکتورهای رشد: پروبیوتیک ها باعث افزایش فعالیت های گوارشی و آنزیمی و تحریک اشتها (Irianto and Austin, 2002a, 2002b)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین ها و برخی آنزیم ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش رشد و توسعه سطوح غذا می شوند (Merrifield et al., 2009a). در این تحقیق نیز افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره غذایی ماهی قزل آلا ی رنگین کمان بطور معنی دار موجب بهبود فاکتورهای مختلف رشد در تیمار ۲ نسبت به سایر تیمارها و شاهد گردید. بهبود شاخص های رشد در تیمارهای پروبیوتیکی را می توان در برخی تحقیقات دیگر نیز مشاهده نمود. استفاده از باکتری *Pediococcus acidilactici* در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان منجر به افزایش وزن شده است (Aubin et al., 2005a). همچنین این اثر در ماهی تیلایای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Shelby et al., 2006) و گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) (Shelby et al., 2007) نیز ثابت شده است. Gatesoupe و همکاران (1999) بیان نمودند که برخی

پروبیوتیک ها اشتها را افزایش می دهند و افزایش کلی را در فاکتورهای رشد، از جمله وزن بوجود می آورند. Azari Takami و همکاران (2004) نشان دادند که رشد تحت تاثیر باسیلوس های زیست یار ارتقاء یافت. در تحقیق Naseri و همکاران (2008) نیز به درستی نقش مثبت پروبیوتیک ها در افزایش وزن لارو ماهیان قزل آلا اشاره شد. با توجه به رابطه مستقیم بین طول و وزن در مراحل رشد این نتیجه قابل پیش بینی است که در تیمار ۲ بیشترین مقدار طول کل را شاهد باشیم (Ghaljaei fard, 2013). چنین پدیده مثبتی در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان توسط محققین دیگر نیز بدست آمده است (Jafarian et al., 2005a; Aubin et al., 2008; Naseri et al., 2007). کمترین ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار ۲ که حداکثر وزن را دارا بود مشاهده گردید. Khatatab و همکاران (2005) با استفاده از پروبیوتیک *M. luteus* بر روی ماهی تیلایا "*Oreochromis niloticus*" ضریب تبدیل غذایی پایین تری را بدست آوردند. همچنین در مطالعه Shenavar و همکاران (2013)، ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی باکتری *L. lactis* نسبت به کنترل بر روی تاس ماهی ایرانی "*Acipenser persicus*" بهبود معنی داری داشته

است. درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در تیمار ۲ در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود. علت این امر می تواند سنتز ویتامین ها، کوفاکتورها و افزایش فعالیت آنزیمی توسط پروبیوتیک ها اشاره کرد که باعث بهبود عملکرد دستگاه گوارش می شود (Fuller, 1989; Jorj, 1998; Gatesoupe, 1999). این یافته ها با نتایج به دست آمده از برخی محققان نیز مطابقت دارد. بطوریکه Taoka و همکاران (2006) هم ضریب رشد ویژه و درصد افزایش وزن بالاتری را در فلاندر ژاپنی *Paralichthys oliraceus* در تیمارهای پروبیوتیکی به دست آوردند. همچنین Naseri و همکاران (2008) نیز به نتایج مثبتی در استفاده از پروبیوتیک BioPlus2B در لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان دست یافت. Shenavar و همکاران (2013) ضریب رشد بالاتری را در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به شاهد بر روی تاس ماهی ایرانی مشاهده کردند. علت این امر را می توان به عملکرد باکتری پلاتناروم نسبت داد که با ترشح آنزیم های خارج سلولی، باعث هضم بهتر، و در نتیجه ضریب رشد بهتر را ایجاد می نماید (Gosh et al., 2002).

فلور باکتریایی روده : با افزایش باکتری *L.plantarum*

در غذا، میزان حضور این پروبیوتیک در روده تا تیمار ۵ افزایش یافت که خود تأییدی بر این واقعیت است که همزمان با افزایش سطح پروبیوتیک در غذا، نسبت این باکتری در روده تغییر می کند ولی میزان توتال کانت با افزایش سطوح پروبیوتیک کاهش یافته است. Ringo و همکاران (1996)، در آزمایشی که بر روی لارو کفشک (*Scophthalmus maximus*) انجام داده بودند دریافتند که میکروفلور روده در لارو کفشک قویاً تحت تأثیر *Vibrio* قرار گرفته بود و بخش زیادی از فلور روده را تشکیل داده بودند. Naseri و همکاران نیز (2008) به این

نتیجه رسید که هرچه میزان پروبیوتیک افزوده شده به غذا بیشتر باشد، به همان نسبت مقدار آن در روده ماهی قزل آلا رنگین کمان بیشتر می شود. همچنین مطالعه Shenavar و همکاران (2013) بر روی تاسماهی ایرانی نشان داد که در سطوح مختلف تیمارهای پروبیوتیک میانگین شمارش باکتری های روده نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار آماری وجود دارد، می توان نتیجه گیری کرد که با افزایش فلور باکتریایی اسید لاکتیک، میزان فلور کلی باکتریایی کاهش می یابد (Ghaljaei fard, 2013)، همانطور که He و همکاران (2009) نشان دادند که با افزایش سطح مکمل DVAQUA (*Saccharomyces cerevisiae*)، مقدار باکتری های مفید افزایش می یابد. افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس پلاتناروم در روده ی ماهی می تواند دال بر قدرت جاگیری بالای این باکتری ها در روده ی بچه ماهی قزل آلا باشد، از طرفی با توجه به اینکه باکتری ها یی که در این آزمایش بکار رفتند قادرند مواد آنتی بیوتیکی مثل باسیتراسین، ژرامیسیدین و پلی میکسین تولید کنند، از این رو بر اساس فرضیه ی Moriarty (1998) این ترکیبات احتمالاً می توانند جمعیت باکتری های دیگر را کاهش داده باشد و یا می توان این کاهش را با این واقعیت شرح داد که پلاتناروم در محیط قادر بوده در رقابت بر سر مواد مغذی بر باکتری های دیگر غلبه کنند و در نتیجه ی رشد سریع تر، محیط را اشغال کنند که با مطالعه ی سطوح مختلف پروبیوتیک توسط Merrifield و همکاران (2009a, 2009b) که بر روی قزل آلا رنگین کمان انجام گرفت تطابق دارد.

آنالیز لاشه: نتایج در بکارگیری پروبیوتیک ها در ترکیب لاشه متناقض بوده است. در تیمار ۴ میزان بالاتری از درصد پروتئین خام در آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه ماهی قزل آلا رنگین کمان را نشان داده است. میزان بالاتر

منابع

- Abdel-Tawwab M, Mousa MMA, Sharaf SM, Ahmed MH., 2005. Effect of crowding stress on some physiological functions of Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus* L) fed different dietary protein levels. *Int. Journal Zoology. Research.*, 1(1): 41- 47.
- Aubin, J., Gatesoupe, F. J., Labbe, L. and Lebrun, L., 2005a. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture research*. 36, 758-767.
- Azari Takami, G., Ziaenezhad, S., Mirvaghefi, A. and Shakori, M., 2004. The effects of Protexin aquatech as a probiotic on digestive enzyme activity of Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) larvae. *Journal of veterinary science*. 1(1): 15-22 .
- Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizadeh, M. and Farzanfar, A., 2008. Growth , Survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two month first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* . 8:43-48 .
- Douillet, P.A. and Langdon, C.J., 1994. Use of a probiotic for the culture of pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) . *Aquaculture* , 199:25-40
- Falahatkar, B., Soltani, M., Abtahi, B., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M. and yasemi, M., 2006. Effect of Vitamin C on some growth parameters , survival and hepatosomatic index in juvenile cultured beluga (*Huso huso*) . *Pajouhesh-va-Sazandegi*. 72:98-103. (in Persian).
- Farzanfar, A., 1993. Water quality in the breeding of salmon. *Aquaculture Magazine* , No.10:16-20.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals . *Journal of Applied Bacteriology* . 66:365-378.
- Fuller, R., 1992. The Scientific basis . Probiotics . *Chapman and Hall.london*.
- Fuller, R., and Perdigon, G. 2003. Gut flora, immunity and health. Blackwell publishing. 276 p.
- Garriques, D. and Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of penaeus vannamei

پروتئین لاشه در ماهی قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در ماهی تغذیه شده با پروبیوتیک بعنوان مکمل رژیم غذایی (Bagheri et al., 2008) و در ماهیان خاویاری فیل ماهی (*Huso huso*) ، (Falahatkar et al., 2006) گزارش شده است. افزایش میزان پروتئین و نسبت کارایی پروتئین در تیمار ۴ نسبت به تیمار ۱ و ۲ و شاهد احتمالاً ناشی از توانایی باکتری های اسید لاکتیک برای تولید آنزیم پروتئاز در لوله ی گوارشی (Irianto and Austin, 2002) و بهبود هضم و جذب ترکیبات پروتئینی می باشد (Fuller and Perdigon, 2003). میزان چربی لاشه ، رطوبت لاشه و خاکستر لاشه در تیمارها معنی دار نمی باشند که با مطالعه (Merrifield et al., 2009a, 2009b) بر روی قزل آلاي رنگين کمان با تغذیه ————— *B. subtilis* ، *B. licheniformis* و *E. faecium* مطابقت دارد. تغییرات در محتوای پروتئین و لیپید لاشه ماهی می تواند به تغییرات در سنتز آنها و میزان ذخیره آنها در ماهیچه ماهی نیز ارتباط داشته باشد (Abdel-tawwab et al., 2005).

با توجه به نتایج بدست آمده در خصوص فاکتور های رشد و فلور باکتریایی روده مشاهده می شود که محدوده ی بکارگیری این باکتری *Lactobacillus plantarum* با دوز ۱۰^۷-۱۰^۹ CFU/باکتری بر گرم غذا را می توان به عنوان تحریک کننده رشد و کاهش دهنده ی میزان فلور میکروبی روده که حاوی باکتری های فرصت طلب و بیماری زا هستند معرفی نمود .

تشکر قدردانی

در پایان لازم می دانیم از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ گونه کمک و کوششی دریغ نورزیدند تشکر و قدر دانی نماییم.

- Kim, D. H., Austin, B. 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shelfish Immunol.* 21:513-524.
- Majedi, M., 1997.** Food chemical testing procedures. Publishing Institute affiliated to university jihad:121 p.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Bakre, R.T.M. and Davies, S.J., 2009a .** Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I . Effects on growth performance , feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria . *Aquaculture Nutrition* DOI:10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Bakre, R.T.M. and Davies, S.J., 2009b.** Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II . Effects on growth performance , feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment . *Aquaculture Nutrition* DOI:10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B. and Davies, S.J., 2011.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization , intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) . *Aquaculture Nutrition* 17,73-79.
- Moriarty, D.J.W., 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture.* 164: 351–358.
- Naseri, S., Nezami, Sh.A., Khara, H., Farzanfar, A., Lashtoo Aghaei, Gh.R. and Shakoori, M., 2008.** The study of growth performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae with different levels of probiotic and iron in use of supplemented in diet. *Iranian Scientific fisheries Journal.* Vol.22.No.1.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. M. 2003.** Immune enhancement in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shelfish Immunol.* 15: 443-452
- Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. and Vigneulle, M., 1990.** Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marin post larvae in Ecuador . in :Browdy C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming Sandiego , CA , USA. *The Word Aquqculture Society.*Pp:53-59.
- Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture : areview. *Aquaculture.*180 : 147-165.
- Ghaljaei fard, 2013.** Effect of *Lactobacillus plantarum* (KC426951) bacteria isolated from the intestine of rainbow trout Gilan on growth factors, bacterial flora in the intestines, blood factors and immune of fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. M.Sc. Thesis, Departent of Natural Resources, Islamic azad university lahijan branch, 121 p.
- Gosh, K., Sen,S.k . and Ray, A.K., 2002.** Growth and survival of *Rohu* , *Labeo rohita* (Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora . *Acta. Ichthology piscatorial* .32(1) : 83-92 .
- He, SX., Zhou, ZG., Liu, YC., Shi, PJ . andYao, B., 2009.** Effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on Growth performance , intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O.aureus*) cultured in cages. *Aquaculture* , 294:99-107.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002a.** probiotics in aquaculture : Reviews *Journal of Fish Diseases* . 25:633-642 .
- Irianto, A. and Austin, B., 2002b.** use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*,25 : 333-342.
- Jafarian, H., Azari Takami, G., Kamali, A., Soltani, M. and Habibirezaei, 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.*, Vol.14(2).
- Jorj, D.E., 1998.** Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquaculture Magazine* . 24:62-67.
- Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E. and Abdel – Rhman, A.A., 2005.** Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus* . *Aquaculture* .28:74-81.

- Shenavar Masouleh, A., 2013.** Characterization of lactic acid bacteria in intestine of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings and their efficiency on the growth performances and some immunophysiological variable. Thesis submitted for Degree of Ph.D. Faculty of Aquatic Animal Health Veterinary Medicine, University of Tehran. 140 p.
- Shepherd, J. and Bromage, N., 1992.** Intensive fish farming. *Blackwell Scientific publications*. P:29.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K. and Koshio, S., 2006.** Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science* .72(2):310-321.
- Timmons, M.B., Holder, J.L. and Ebeling, J.M., 2006.** Application of microbead biological filters. *Aquaculture Engineering*.34,332-343.
- Tuber, M. 2001.** Veterinary use and antibiotic resistance laboratory of Food microbiology, *Current Opinion in Microbiology*.4(5):493-9.
- Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular Biology Reviews*.64:655-671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2004a.** In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish in testinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.231:145-152.
- environment. *Oceanography and Marine Biology . An Annual Review* . 28:277-352.
- Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E. and Buchmann, K., 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *Bolicheniformis* (BioPlus2B). *Journal of fish Diseases*.26:496-498.
- Ringo, E., Birkbeck, T.H., Munro, P.D., Vadstein, O. and Hjelmeland, K., 1996.** The effect of early exposure to *vibrio Pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Bacteriology*.81:207-211.
- Rorvik, K.A., Salte, R., Bentsen, H.B. and Thomassen, M., 1991.** Effects of dietary iron and n-3 unsaturated fatty acids (omega-3) on health and immunological parameters in farmed salmon. P:86. In Proceedings of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists.
- European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary.
- Sealy, W.M. and Gatlin, D.M., 2001.** Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish . Lim , C., Webster, C.D., (Ed). *Nutrition and fish health*. Howorth press, Binghamton. U.S.A.
- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim – Aksoy, M. and Delaney, M.A., 2006.** Effects of probiotic supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia. (*Oreochromis niloticus*) . *Journal of Applied Aquaculture*.18,22-34.
- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim – Aksoy, M. and Klesius p.H., 2007.** Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young channel catfish , *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Applied Aquaculture*.19,81-9

Effect of *Lactobacillus plantarum* (KC426951) bacteria isolated from the intestine of rainbow trout Guilan on growth factors, carcass composition and the intestinal bacterial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerling

Afshin Ghaljaei Fard^{*1}, Hossein Khara², Alireza Shenavar Masouleh³

1- M.Sc. Graduated, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resource , Lahijan Branch , Islamic Azad University, Lahijan,

2- Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resource , Lahijan Branch , Islamic Azad University, Lahijan

3- M.Sc. Graduated, International Sturgeon Research Institute, Rasht

Received: 26.07.2014 Accepted: 21.01.2015

*Corresponding author: A78fard @ gmail.com

Abstract:

The present study was conducted to evaluate the effect of *Lactobacillus plantarum* (KC426951) isolated from the intestine of rainbow trout Guilan on growth factors, carcass composition and the intestinal bacterial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was conducted. Rainbow trout weighing 3.56 ± 2.24 for 2 weeks were consistent with environmental rearing conditions. Five groups of fish were fed with diets containing 10^6 (T1), 10^7 (T2), 10^8 (T3), 10^9 (T4), 10^{10} (T5) cfu g⁻¹ of *L. plantarum* and control group (T6) without diet containing probiotics were fed for 60 days. Results showed that final weight, final length, growth rate, percent weight were gained in treatment 2 the highest and 5 the lowest level in treated. Also, FCR lowest rates in treatment 2 and treatment 5 were accounted for most ($p < 0.05$). The highest total count of lactic acid bacteria were obtained in the intestine of T4 ($p < 0.05$). Maximum carcass protein was observed in T4, and low fat content is related to the control treatment ($p < 0.05$). According to the results obtained from the use of *Lactobacillus plantarum* could be considered as a positive factor for the improvement of the intestinal bacterial flora, growth performance and carcass composition could be used.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss* , *Lactobacillus plantarum* , growth, Lactic acid bacterial , intestinal bacterial flora , carcass composition