ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جدا شده از کفیر و تاثیر آن بر برخی شاخصه‌های هماتولوژی و رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

محسن علی[۱]، سیاوش سلطانیان*[۱]، علی طاهری میرقائد*[۲]، مصطفی اخلاقی[۱]، سیدحسین حسینی‌فر[۳]، عاطفه اسماعیل نژاد[۴]

[۱]گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

[۲]گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[۳]گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[۴]گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، ایران.

*نویسندگان مسئول: mirghaed@ut.ac.ir و siyavashsoltanian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۶

چکیده

دانه‌های کفیر به‌عنوان یک منبع طبیعی از سویه‌های پروبیوتیکی متعلق به خانواده لاکتیک اسید باکتری‌ها است. هدف این پژوهش جداسازی و شناسایی سویه‌هایی از لاکتیک اسید باکتری‌های کفیر بود که ضمن ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها، تاثیر تجویز خوراکی آن‌ها بر برخی شاخصه‌های هماتولوژی و رشد در ماهی قزل آلا نیز بررسی شد. یافته‌ها حاکی از جداسازی و شناسایی سویه‌های *Lactobacillus farraginis* و *Enterococcus durans* بود که خصوصیات مهم سویه‌های پروبیوتیکی از جمله مقاوم بودن به شرایط اسیدی، شیره معده و نمک‌های صفراوی، همچنین توان آبگریزی مناسب و فعالیت آنتاگونیستی علیه برخی سویه‌های بیماری‌زا را نیز نشان دادند. سپس تعداد۴۸۰ قطعه بچه ماهی با وزن ۴۱/۹±۲/۴ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی به ۸ گروه ۲۰ قطعه‌ای در سه تکرار تقسیم شدند. تیمار شاهد (جیره پایه)، تیمارهای L1 و E1 به‌ترتیب (جیره پایه+*L. farraginis*) و (جیره پایه+ *E. durans*) دوز $۱۰^{۷}$ (کلنی/گرم)؛ تیمارهای L2 و E2 دوز $۱۰^{۸}$ و تیمارهای ترکیبی (L1+E1) $۵×۱۰^{۶}$ و (L2+E2) $۵×۱۰^{۷}$ (کلنی/گرم) از هر سویه را دریافت کردند و تیمار باکتوسل (جیره پایه+ *Pediococcus acidilacticilactis*) $۱۰^{۱۰}$ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۴۵ روز از شروع آزمایش نمونه‌برداری از تیمارها صورت پذیرفت. طبق یافته‌ها شمار کلی گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، سطح هموگلوبین، میانگین غلظت آن و پارامترهای رشد شامل BWI، SGR و CF در تیمارهای L2+E2، Bactocell، L2 و E2 نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P<0.05$)، در حالی‌که کاهش FCR در گروه‌های مذکور نسبت به شاهد مشهود بود. در مجموع هر دو سویه کاندیدای پروبیوتیکی مناسبی برای افزودن به جیره قزل آلا باشند، لیکن این امر نیازمند مطالعات بیشتری در زمینه آزمون‌های برون‌تنی و دورن تنی است.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس، کفیر، پروبیوتیک، قزل آلا.

مقدمه

در حال حاضر پروبیوتیک‌ها در قالب میکروارگانیسم های زنده و مرده در حوزه آبزی‌پروری توانسته‌اند موجب القاء اثرات مثبت بر میزبان و محیط پیرامون آن شوند (Lazado and Caipang, 2014). امروزه از شایع‌ترین سویه‌های پروبیوتیکی که به خانواده لاکتیک اسید باکتری‌ها (LAB: Lactic Acid Bacteria) تعلق داشته و در صنعت آبزی‌پروری نیز به‌کار گرفته شده‌اند، می‌توان به جنس‌های *Lactobacillus*، *Enterococcus*، *Pediococcus*، *Streptococcus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc* و *Carnobacterium* اشاره کرد (Roman *et al.*, 2012). از جمله کاربردهای لاکتیک اسید باکتری‌ها در صنعت آبزی‌پروری می‌توان به ارتقاء سطح پارامترهای رشد، راندمان تغذیه، کنترل رشد میکروارگانیسم‌های مضر در روده و جلوگیری از فعالیت پاتوژن‌های بیماری‌زای ماهی اشاره کرد (Panigrahi *et al.*, 2005; Suzer *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2012). تاکنون بسیاری از باکتری‌های جنس *Lactobacillus* متعلق به خانواده LAB به‌عنوان سویه‌های امن (GRAS: Generally Recognized As Safe) شناخته شده‌اند (Soccol

et al., 2010). از سوی دیگر برخی از جنس‌های *Enterococcus* نیز به‌عنوان پروبیوتیک شناخته شده و همچنین به‌عنوان مکمل‌های افزودنی در خوراک حیوانات با هدف بهبود رشد و جلوگیری از اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Franz *et al.*, 2011). از طرفی جنس مذکور تا به امروز در لیست سویه‌های امن قرار نگرفته است (Huys *et al.*, 2013). در میان سویه‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید بسیاری از خصوصیات یک پروبیوتیکی مناسب از جمله مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی، اسید معده، آنزیم‌های گوارشی، و همچنین از امکان اتصال به لایه‌های مخاطی و موکوزال لوله گوارش (روده) نیز برخوردارند (Fioramonti *et al.*, 2003). جنس *Lactobacillus* از مهمترین اعضاء خانواده لاکتیک اسید باکتری‌ها بوده (Makarova *et al.*, 2006) و گونه‌هایی از جنس *Enterococcus* با ویژگی‌های پروبیوتیکی نیز امروزه در صنعت تغذیه خوک و طیور مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Liu *et al.*, 2014).

کفیر یک نوشیدنی سنتی و قدیمی است که به طور گسترده‌ای در شرق اروپا، آسیای جنوب غربی و بسیاری از مناطق دیگر جهان استفاده شده و منشا آن کوه‌های قفقاز در روسیه است. همچنین کفیر به‌عنوان یک پروبیوتیک کمپلکس و نوعی محصول لبنی بوده که از تخمیر شیر به‌دست می‌آید (Atalan *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005). از سوی دیگر میکروبیولوژی دانه‌های کفیر موضوعی است که توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نمود است (Atalan *et al.*, 2003). براساس یک پژوهش کفیر به‌عنوان یک منبع طبیعی غنی از جنس‌های *Lactobacillus* شناخته شده است (Uluköy *et al.*, 2015). همچنین از جمله سویه‌های دیگر جدا شده از کفیر که به خانواده LAB نیز تعلق دارند، می‌توان به جنس‌های *Enterococcus* و *Streptococcus* اشاره کرد (Rosi and Rossi, 1978; Yuksekdag *et al.*, 2004). براساس مطالعات پیشین برخی از میکروارگانیسم‌های موجود در کفیر خصوصیات یک پروبیوتیک بالقوه را نشان داده‌اند (Bolla *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013). از جمله خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از دانه‌های کفیر می‌توان به مقاومت بالای آن‌ها در شرایط اسیدی معده، نمک‌های صفراوی و همچنین قابلیت اتصال و چسبندگی مناسب به اپیتلیال دستگاه گوارش، و از سوی دیگر به عدم فعالیت‌های آنزیمی یا همولیتیک نامطلوب آنها اشاره کرد (Zheng *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2015). از سوی دیگر طبق پژوهش‌های پیشین، فعالیت آنتاگونیستی سویه‌هایی از LAB جدا شده از کفیر علیه برخی پاتوژن‌های بیماری‌زا نیز در شرایط آزمایشگاهی تایید شده است (Carasi *et al.*, 2014; Zanirati *et al.*, 2014).

در حال حاضر تحقیقات در مورد شناسایی سویه‌های جدید پروبیوتیکی برای پاسخ به تقاضای روز افزون بازار مصرف، رو به افزایش است (Bertazzoni *et al.*, 2004). همچنین مطالعات پیشین همواره جداسازی و ارزیابی سویه‌های LAB کفیر را با هدف بررسی خصوصیات پروبیوتیکی پیشنهاد کرده‌اند (Golowczyc *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2013). از آن‌جا که پروبیوتیک‌ها اغلب در خوراک ماهی‌ها لحاظ شده و جزو افزودنی‌های جیره محسوب می‌شوند (Verschuere *et al.*, 2000)، به‌منظور بررسی وضعیت اثربخشی مکمل‌های به‌کار رفته در جیره و پایش سلامت ماهیان می‌توان از شاخصه‌های مهم و قابل اطمینانی مانند ارزیابی پارمترهای خونی استفاده کرد (Fanouraki *et al.*, 2007)، چراکه بررسی متغیرها و شاخصه‌های خونی در ماهیان می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با تغییرات فیزیولوژیک رخ داده در بدن آن‌ها در اختیار محقق قرار دهد (Adeyemo, 2007). از آن‌جائی‌که تاکنون در هیچ یک از پژوهش‌های پیشین، جداسازی سویه‌های لاکتیک اسید باکتری‌های کفیر و ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها با هدف افزودن به جیره گونه پرورشی مهمی چون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان صورت نگرفته است، و از سوی دیگر در تعداد محدودی از مطالعات پیشین تنها کاربرد مستقیم دانه‌های کفیر در جیره ماهیان پرورشی مورد ارزیابی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر در مرحله نخست شناسایی مولکولی و ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌هایی از لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده از

دانه‌های کفیر انجام شد. در مرحله بعد پس از افزودن مقادیر متفاوت از سویه‌های جدا شده به جیره بچه ماهی‌های قزل‌آلا رنگین کمان تاثیر آن‌ها بر برخی فاکتورهای هماتولوژی و رشد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه‌های *Lactobacillus* و *Enterococcus* از کفیر: ابتدا فرایند انکوباسیون دانه‌های کفیر در شیر طبق رفرنس صورت گرفت (Unal and Arslanoglu, 2013; Wszolek *et al.*, 2006). سپس دانه‌های کفیر از شیر جداسازی و هموژن شده و برروی محیط MRS agar کشت داده شدند. آن‌گاه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Uluköy *et al.*, 2017). سپس به‌منظور خالص‌سازی سویه‌ها کشت ساب کالچر تهیه شد. در مرحله بعد جهت شناسایی سویه‌ها ابتدا رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت، و جهت تایید رنگ‌آمیزی از تست حلالیت در محلول پتاس (KOH) استفاده شد (Suslow *et al.*,1982). همچنین، جهت انجام تست کاتالاز از محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2) (Macfaddin, 2000) و تست اکسیداز با استفاده از معرف اکسیداز (N,N,N',N'- Tetramethyl-p-phenylenediamine) صورت پذیرفت (Krieg and Padgett, 2011). از سوی دیگر به‌منظور شناسایی مولکولی سویه‌ها از ژن شناساگر ۱۶SrRNA استفاده شد. استخراج DNA سویه‌ها با استفاده از کیت سیناژن صورت گرفت (Marmur, 1961). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و (1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') انجام شد و تایید آن بر روی ژل آگارز صورت گرفت. توالی‌یابی محصول نهایی با استفاده از نرم‌افزار BLASTn با توالی معتبر ثبت شد در پایگاه ژنی NCBI مقایسه و نزدیکترین جدایه براساس مشابهت در توالی ژنی ۱۶SRNA شناسایی شد.

آزمون‌های بررسی توان پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از کفیر: جهت بررسی فعالیت همولیز سویه‌ها از محیط کشت بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفندی دفیبرینه استفاده شد. سویه *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) به‌عنوان کنترل مثبت لحاظ شد (Leite *et al.*, 2015). همچنین به‌منظور ارزیابی مقاومت سویه‌ها در برابر اسیدیته دستگاه گوارش وضعیت رشد آن‌ها در محیط کشت حاوی اسید کلریدریک با pH های ۲/۵، ۳ و ۴ بررسی شد، به‌طوری‌که تعداد کلنی‌های رشد یافته در مقادیر مختلف اسید پس از گذشت ۴ ساعت برحسب میانگین لگاریتم کلنی‌های شمارش شده، ثبت گردید (Klayraung *et al.*, 2008). از جمله آزمون‌های پروبیوتیکی دیگر بررسی میزان مقاومت سویه‌ها در مواجهه با شیره معده حاوی آنزیم‌های پپسین و تریپسین بود که در محیط حاوی اسیدکلریدریک غلیظ با pH معادل ۲ انجام شد. سپس سویه‌ها به‌مدت ۱، ۲ و ۳ ساعت مواجهه، گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت شمارش کلنی‌های رشد یافته صورت گرفت (Wang *et al.*, 2010). جهت ارزیابی مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی بر اساس Walker و Gilliland (۱۹۹۳) پس از تهیه محیط‌های کشت حاوی نمک‌های صفراوی در مقادیر ۰ ، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سوسپانسیونی از سویه‌ها به محیط‌های مذکور اضافه شد (۰٪ گروه کنترل فاقد نمک صفراوی). سپس جذب نوری (OD) محیط‌ها قبل و بعد از انکوباسیون در زمان‌های ۰ و ۸ ساعت توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تعیین ضریب بازدارندگی نمک‌های صفراوی از فرمول Gopal استفاده شد (Gopal *et al* ., 1996).

$$Cinh = \Delta T8\text{-}T0\ Control - \Delta T8 - T0\ Treatment / \Delta T8 - T0\ Control$$

که در آن Cinh: ضریب بازدارندگی رشد سویه‌ها و Δ: تفاوت جذب OD بین زمان ۰ و ۸ ساعت است. همچنین وضعیت هیدروفوبیسیتی (توان آبگریزی) سویه‌ها بر مبنای میزان چسبندگی سویه‌ها به هیدروکربن‌های مایع همچون n-Hexadecane انجام شد (Goldberg *et al.*, 1990). ابتدا با استفاده از محیط کشت مایع MRS broth سوسپانسیونی از سویه‌ها تهیه شد و غلظت آن‌ها با جذب نوری ۱ با طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر تنظیم

گردید. سپس سوسپانسیون‌ها با محلول n-Hexadecane در داخل میکروتیوپ‌ها ترکیب و انکوبه شدند که طی آن دو فاز آبی و روغنی در اپندورف‌ها تشکیل شد. سپس جذب نوری فاز آبی توسط اسپکتروفتومتر ثبت گردید. در پایان درصد آبگریزی طبق فرمول ذیل محاسبه گردید (Goldberg *et al.*, 1990).

درصد آبگریزی = ۱۰۰ × (جذب نوری اولیه) / (جذب نوری ثانویه – جذب نوری اولیه)

از سوی دیگر جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی، ابتدا سویه‌ها در محیط MRS broth در دما و زمان مناسب کشت داده شدند و پس از سانتریفیوژ از فیلتر استریل عبور داده شدند (Balcazar *et al.*, 2008). سپس سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند از سویه‌های بیماری‌زای مهم ماهی قزل آلا شامل *L. garvieae* Ir-LGT-MS-1 (KF918779)، *S. iniae* (GQ850377) و *Aeromonas hydrophila* (AH04) رشد یافته در محیط TSA، به پلیت‌های حاوی مولر هینتون آگار اضافه و کشت داده شدند. سپس چاهک‌هایی بر روی محیط‌های کشت حفر شد و سوسپانسیونی از هر سویه به چاهک‌ها منتقل شدند، سپس پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شده و پس از ۲۴ ساعت مهار رشد باکتری‌های پاتوژن براساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Balouiri *et al.*, 2016).

تیماربندی ماهی‌ها و شرایط پرورش: تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی قزل آلا به‌ترتیب با میانگین وزنی و طولی ۴۱/۹±۲/۴ گرم و ۱۴/۵±۰/۵ سانتی‌متر از مزارع اطراف تهران تهیه شد. دورهٔ آداپتاسیون ماهی‌ها ۱۰ روز بود و اطمینان از سالم بودن ماهی‌ها نیز طی این دوره حاصل شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب در طول دوره آزمایش شامل میانگین دمایی ۱۸±۱/۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۷/۵±۰/۵، میزان اکسیژن محلول ۸/۵±۰/۵ و میزان سختی آب ۱۸۰±۱۵ میلی گرم/ لیتر کربنات‌کلسیم ثبت گردید. همچنین میزان آمونیاک و نیتریت ≤۰/۰۱ و نیترات ≤ ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. در کل دوره تیمار تعویض روزانه آب مخازن، و همچنین به‌طور شبانه‌روزی هوادهی مخازن انجام شد. غذادهی به‌میزان ۳ درصد وزن بدن و روزی چهار مرتبه صورت گرفت. به‌منظور تیماربندی، ماهی‌ها به‌طور تصادفی در ۸ تیمار و سه تکرار به ۲۴ مخزن معرفی شدند (۲۰ قطعه ماهی در هر تانک) بدین‌صورت که تیمار کنترل (جیره پایه+ فاقد سویه باکتریایی)، تیمارهای L1 (جیره پایه + سویه *L. farraginis*) و E1 (جیره پایه + سویه *Enterococcus durans*) هر کدام دوز 10^{7} (کلنی/گرم)؛ باکتوسل (جیره پایه + *Pediococcus acidilacticilactis*) 10^{10} (کلنی/گرم) به‌عنوان کنترل مثبت؛ تیمارهای L2 و E2 هر یک دوز 10^{8} (کلنی/گرم) و تیمارهای ترکیبی L1+E1 5×10^{6} و L2+E2 5×10^{7} (کلنی/گرم) از هر سویه را شامل شدند.

روش آماده‌سازی و تهیه جیره ماهیان تحت تیمار: ابتدا پودر لیوفیلیزه از سویه‌ها تهیه شد (John *et al.*, 2007) و شمارش کلنی‌ها در هر گرم از پودر لیوفیلیزه، انجام پذیرفت (Li *et al.*, 2012). در مرحله بعد با توجه به دمای آب و وزن ماهی‌ها مقادیر خوراک روزانه تیمارها تعیین شدند. سپس با توجه به تعداد کلنی‌های شمارش شده در هر گرم از پودر لیوفیلیزه، مقادیر تعیین شده برای هر سویه توزین و سپس در روغن خوراکی حل شده و بر روی خوراک تجاری ماهی به‌طور یکنواخت در سطح پلت‌ها اسپری شده و مخلوط گردید. همچنین برای تیمار شاهد، تمامی مراحل فوق بدون افزودن سویه‌ها انجام پذیرفت. سپس جیره‌ها در شرایط دمایی و زمانی مناسب خشک شده و نگهداری آن‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (Panigrahi *et al.*, 2004).

خونگیری از ماهیان: پس از بیهوش کردن ۳۰ قطعه ماهی از هر تیمار (۱۰ قطعه از هر تکرار) با استفاده از محلول پودر گل میخک و آب به میزان ۱۵۰ پی‌پی‌ام خونگیری از ناحیه ورید ساقه دمی ماهی‌ها به منظور تهیه خون هپارینه جهت سنجش پارامترهای هماتولوژی انجام پذیرفت.

سنجش پارامترهای هماتولوژی: شمارش کلی گلبول‌های قرمز با استفاده از لام Haemocytometer و محلول‌های Hayem and Turck براساس رفرنس صورت گرفت (Blaxhall and Daisley, 1973). اندازه‌گیری هماتوکریت به روش Microhematocrit

جدول ۱ - تحمل سویه‌های جداشده از دانه‌های کفیر بعد از مواجهه با سطوح مختلف pH پس از ۴ ساعت، برحسب میانگین لگاریتم کلنی‌های شمارش شده (Mean±S.D).

سویه باکتریایی و تعداد کلنی‌ها بر حسب Log(Cfu/ml±SD)	pH		
	۲/۵	۳	۴
Lactobacillus farraginis	۶/۶۲± ۰/۰۷ ab	۶/۷۲±۰/۰۶ ab	۶/۸۴±۰/۰۳ a
Enterococcus durans	۶/۹۴±۰/۰۶ ab	۶/۹۶±۰/۰۵ ab	۷/۰۷ ±/۰۴ a

حروف غیر همسان (a,b,c) در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) است.

با استفاه از سانتریفیوژ و خط‌کش مخصوص هماتوکریت بر اساس درصد انجام شد (Brown, 1988). همچنین سنجش هموگلوبین به روش Cyanomethemoglobin با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر و بر حسب g/dl^{-1} تعیین شد (Larsen, 1964)، محاسبه پارامترهای MCV، MCH و MCHC نیز تعیین شدند (Benfey and Sutterlin, 1984) .

سنجش پارامترهای رشد: به‌منظور بیومتری فاکتورهای رشد بچه ماهی‌ها در انتهای دوره ۴۵ روزه، از هر گروه ۳۰ قطعه ماهی (۱۰ قطعه از هر تکرار) به‌صورت کاملا" تصادفی صید شدند و وزن آن‌ها با دقت ۰/۰۱ گرم و طول با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس شاخص‌های رشد شامل درصد افزایش وزن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و فاکتور وضعیت (CF) محاسبه شدند (Wahli *et al.*, 2003).

روش آماری و تجزیه تحلیل داده‌ها: به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها نخست همه آن‌ها در نرم‌افزار Excel 2007 جمع‌آوری شدند. سپس آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) انجام شد، به‌دنبال آن در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون آماری توکی (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵٪، و سطح معنی داری ($P<۰/۰۵$) و به کمک نرم افزار آماری SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام پذیرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های *Lactobacillus* و *Enterococcus* : نتایج حاکی از جداسازی یک سویه از جنس لاکتوباسیل‌ها و یک سویه از جنس انتروکوکسی‌ها بود. هر دو سویه گرم مثبت بودند که توسط تست KOH تایید شدند. همچنین تست‌های کاتالاز و اکسیداز آن‌ها منفی ارزیابی شد. نتیجه بررسی‌های مولکولی نشان داد *Lactobacillus* و *Enterococcus* جدا شده از کفیر براساس توالی معتبر ثبت شده در NCBI به‌ترتیب با سویه‌های *Lactobacillus farraginis* JCM 14108(T) به‌میزان ۹۹/۷ درصد و سویه *Enterococcus durans* NBRC 100479(T) به میزان ۹۹/۹ درصد قرابت فیلوژنی دارند.

ارزیابی توان پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از کفیر: بررسی فعالیت همولیتیک سویه **L** (*Lactobacillus farraginis*) و E (*Enterococcus durans*) در محیط کشت Blood Agar حاکی از فقدان فعالیت‌های همولیز نوع α، β، γ در اطراف کلونی‌های رشد یافته بود. همچنین طبق نتایج آزمون مقاومت سویه‌ها در برابر محیط اسیدی طی ۴ ساعت (جدول ۱) کاهش شمار کلنی‌ها از پی‌اچ ۴ تا ۲/۵ برای هر دو سویه مشاهده شد، لیکن معنی‌دار نبود ($P<۰/۰۵$). از سوی دیگر نتایج آزمون مواجهه سویه‌ها با شیره معده (پپسین و تریپسین) در جدول ۲ حاکی از عدم تغییر معنی‌دار شمار کلنی‌های سویه *L. farraginis* در طی زمان‌های ۱ الی۳ ساعت بود. ولی در مورد سویه *E. durans* کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) تعداد کلنی‌ها در مواجهه با آنزیم‌های پپسین و تریپسین تنها پس از گذشت ۳ ساعت از مواجهه ثبت گردید. لیکن مطابق با استاندارد ملی ایران ISIRI (Institute of Standards and Industrial Research of Iran) به شماره ۱۹۴۵۹، شمار کلنی‌های کاندیدای پروبیوتیکی پس از مواجهه با اسید و شیره معدی نبایستی از $۱×۱۰^{۶}$ کلنی/ میلی‌لیتر کمتر یا به عبارتی دیگر لگاریتم آن بایستی بیشتر از ۶ باشد (ISIRI, 2012). نتایج

جدول ۲ - مقاومت سویه‌های جدا شده از دانه‌های کفیر در مدت زمان‌های ۱و۲و۳ ساعت مواجهه با آنزیم‌های پپسین و تریپسین (pH=2) بر حسب میانگین لگاریتم کلنی‌های شمارش شده (Mean±S.D).

آنزیم‌های شیره معده	پپسین			تریپسین		
زمان(ساعت)	۱	۲	۳	۱	۲	۳
سویه باکتریایی برحسب Log(Cfu/ml±SD)						
Lactobacillus farraginis	۶/۹۶±۰/۰۵^{a}	۶/۹۴±۰/۰۴^{a}	۶/۸۶±۰/۰۲^{a}	۶/۹۰±۰/۰۵^{a}	۶/۸۵±۰/۰۷^{a}	۶/۸۰±۰/۰۸^{a}
Enterococcus durans	۷/۰۱±۰/۰۴^{a}	۶/۸۸±۰/۰۵^{ab}	۶/۷۰±۰/۰۱^{b}	۷/۲۳±۰/۰۵^{a}	۷/۱۲±۰/۰۲ ^{ab}	۷/۰۳±۰/۰۳^{b}

حروف غیر همسان (a,b,c) در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) است.

جدول ۳ - مقادیر ثبت شده بر اساس جذب نوری محیط‌های کشت حاوی سویه‌های جداشده از دانه‌های کفیر در غلظت‌های متفاوت از نمک‌های صفراوی پس از گذشت ۸ ساعت.

سویه‌های باکتریایی	*Lactobacillus farraginis*		*Enterococcus durans*	
٪نمکهای صفراوی	٪۰/۱۵	٪۰/۳	٪۱۵	٪۰/۳
ضریب بازدارندگی	۰/۴ > ۰/۰۳±۰/۰۰۹*	۰/۴ < ۰/۸۷±۰/۰۱**	۰/۴ >۰/۱±۰/۰۷*	۰/۴ <۰/۹۴±۰/۰۲**

* Cinh ≥۰/۴: نشان دهنده رشد سویه باکتریایی در غلظت تعیین شده نمک‌های صفراوی

** Cinh ≤ ۰/۴ : نشان دهنده عدم رشد سویه باکتریایی در غلظت تعیین شده نمک‌های صفراوی

جدول ۴ - فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های جدا شده از کفیر علیه پاتوژن‌های بیماری‌زای ماهی قزل آلای رنگین کمان.

سویه‌های باکتریایی	***Lactobacillus farraginis***	***Enterococcus durans***
سویه‌های پاتوژن	هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر)	
Lactococcus garvieae	۲±۱۲(+)	۱۲/۲±۵/۵(+)
Streptococcus iniae	۸/۱±۵(-)	۱±۶(-)
Aeromonas hydrophila	۱±۱۲(+)	۱۰/۰±۵/۵(+)

* (+) : میانگین هاله عدم رشد بالاتر از ۱۰ میلی‌متر؛ (-) میانگین هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی‌متر.

حاصل از ارزیابی مقاومت جدایه‌ها به سطوح ۰، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی نشان داد ضریب بازدارندگی (Cinh) در سطح ۰/۱۵ درصد بایل پس از گذشت ۸ ساعت برای سویه *Lactobacillus farraginis* ۰/۰۳ و برای سویه *Enterococcus durans* ۰/۱ محاسبه گردید (جدول ۳) که برای هر دو سویه کمتر از ۰/۴ بود (≤ ۰/۴)، که نشان می‌دهد غلظت ۰/۱۵ درصد از نمک‌های صفراوی نمی‌تواند موجب ممانعت از رشد سویه‌ها شود. در حالی‌که طی مواجه با سطح ۰/۳ درصد، ضریب بازدارندگی برای سویه‌های فاراجینیس ۰/۸۷ و دورانس ۰/۹۴ محاسبه شد که بیشتر از ۰/۴ بود (جدول ۳) که نشان دهنده ممانعت از رشد سویه‌ها در این سطح از بایل بود.

از طرفی بررسی توان آبگریزی سویه‌ها که بر اساس میزان چسبندگی سوسپانسیون باکتریایی به تولوئن (هیدروکربن مایع) در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) انجام شد، بیانگر قابلیت چسبندگی و اتصال سویه‌ها به مخاط روده بود که در مورد سویه *L. farraginis* برابر با ۷۲/۴۷±۳/۵۲ درصد و *E. durans* معادل ۵۱/۴۲±۴/۲۱ درصد به‌دست آمد. همچنین نتایج ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی سویه‌ها، حاکی از تشکیل هاله عدم رشد با میانگین بالاتر از ۱۰ میلی‌متر در محیط کشت حاوی پاتوژن‌های *L. garvieae* و *A. hydrophila* بود (جدول ۴). در حالی‌که میانگین هاله عدم رشد برای *S. iniae* کمتر از ۱۰ میلی‌متر ثبت شد (جدول ۴).

فاکتورهای خونی: براساس نتایج سنجش فاکتورهای خونی، گروه‌های L2+E2، Bactocell، L2، E2 بیشترین مقادیر RBC، Ht، Hb و MCHC را پس از گذشت ۴۵ روز از شروع تغذیه به خود اختصاص دادند (جدول ۵) که در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) افزایش داشت. از طرفی مقدار فاکتورهای مذکور در مورد ماهی‌های تیمارشده با جیره‌های E1 و L1

جدول ۵ - میانگین و انحراف معیار فاکتورهای هماتولوژی بچه ماهی‌های قزل آلای تغذیه شده با سطوح متفاوت از سویه‌های جدا شده از دانه‌های کفیر در انتهای دوره‌ی تیمار (۴۵ روز).

گروه های تیمار	گلبول قرمز RBC ×۱۰^۶ سلول در mm3	هماتوکریت درصد (٪)	هموگلوبین گرم بر دسی لیتر	MCV فمتولیتر	MCH پیکوگرم	MCHC گرم بر دسی لیتر
Control	۰/۹۶±۰/۱۱^{a}	۳۱/۰۶±۱/۱۶^{a}	۵/۴۶±۰/۵۸^{a}	۳۲۷/۲±۴۱/۹۱^{a}	۵۷/۸±۱/۵۷^{a}	۱۷/۶±۱/۶۱^{a}
L1	۱/۰۵±۰/۱۲^{ab}	۳۲/۱۷±۱/۱۱^{a}	۵/۷۲±۰/۴۷^{ab}	۳۱۰/۷±۴۳/۹۹^{ab}	۵۵/۵±۳/۷۲^{a}	۱۷/۸۱±۱/۲۹^{a}
L2	۱/۲۳±۰/۱۳^{cd}	۳۶/۰۳±۱ /۱۶^{c}	۷/۵۳±۰/۳۴^{c}	۲۹۵/۳±۳۰/۷۴^{ab}	۶۱/۷۱±۵/۰۴^{a}	۲۰/۹۴±۱/۳۴^{b}
Bactocell	۱/۲۷±۰/۱۰^{d}	۳۶/۴۷±۱/۰۸^{c}	۷/۶۹±۰/۴۵^{c}	۲۸۷/۲±۲۳/۸۴ ^{ab}	۶۰/۴۹±۴/۸۲ ^{a}	۲۱/۱۱±۱/۴۲^{b}
E1	۱/۰۴±۰/۱۳^{ab}	۳۲/۰۴±۱ /۰۹^{a}	۵/۷±۰/۲۸^{ab}	۳۱۲/۶±۴۱/۲۳^{ab}	۵۵/۴۲±۵/۵۹^{a}	۱۷/۸۱±۱/۰۶^{a}
E2	۱/۲۱±۰/۱۴^{cd}	۳۵/۸۷±۰/۹۴^{bc}	۷/۵۴±۰/۳۳^{c}	۲۹۸/۳±۲۷/۲۴^{ba}	۶۲/۷۴±۶/۶۹^{a}	۲۱/۰۲±۱/۱۸^{b}
L1+E1	۱/۱±۰/۰۸^{bc}	۳۴/۱۲±۱/۷۷^{b}	۶/۵±۰/۲۰^{b}	۳۰۹±۲۶/۶۰^{ab}	۵۸/۷۹±۴/۰۳^{a}	۱۹/۱±۱/۴۲^{ab}
L2+E2	۱/۲۶ ± ۰/۰۹^{d}	۳۶/۲۸±۱/۲۰^{c}	۷/۷ ± ۰/۵۷^{c}	۲۸۷/۹ ± ۱۹/۲۲^{ab}	۶۱/۱۱ ± ۴/۸۶^{a}	۲۱/۲۶ ± ۱/۶۹^{b}

***حروف غیر همسان (a,b,c) در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$) بین تیمارها است.**

جدول ۶ - مقایسه پارامترهای رشد در بچه ماهی‌های قزل آلای تغذیه شده با سطوح متفاوت از سویه‌های جدا شده از کفیر در انتهای دوره‌ی تیمار (۴۵ روز).

گروه‌های تیمار	وزن اولیه (g)	درصد افزایش وزن (%BWI)	نرخ رشد ویژه (%SGR)	فاکتور وضعیت (CF)	ضریب تبدیل غذایی (FCR)
Control	۴۱/۴۲ ± ۱/۲۱^{a}	۱۰۰/۹۵ ± ۸/۶ ^{a}	۱/۵۵ ± ۰/۱^{a}	۰/۹۲ ± ۰/۰۷ ^{a}	۱/۴۶ ± ۰/۱۱^{a}
L1	۴۱/۸۲ ± ۱/۵۵^{a}	۱۰۷/۰۸ ± ۴/۱۱	۱/۶۲ ± ۰/۰۴^{a}	۰/۹۴ ± ۰/۰۶^{ab}	۱/۰۶ ± ۰/۰۵^{b}
L2	۴۲/۱۶ ± ۰/۸۲^{a}	۱۲۰/۴۵ ± ۶/۵۰^{b}	۱/۷۶ ± ۰/۰۷^{b}	۰/۹۵ ± ۰/۰۵^{ab}	۰/۹۶ ± ۰/۱۲^{cd}
Bactocell	۴۲/۴۸ ± ۱/۰۸^{a}	۱۳۸/۷۳ ± ۶/۴۳^{d}	۱/۹۳ ± ۰/۶^{d}	۱/۰۱ ± ۰/۰۴^{b}	۰/۹۱ ± ۰/۰۳^{d}
E1	۴۲/۴۰ ± ۱/۲۶^{a}	۱۲۶/۴۹ ± ۵/۸۹^{bc}	۱/۸۲ ± ۰/۰۵^{b}	۰/۹۸ ± ۰/۰۶^{b}	۱ ± ۰/۰۶^{bc}
E2	۴۱/۹۸ ± ۱/۵۱^{a}	۱۲۹/۰۸ ± ۶/۵۱^{c}	۱/۸۴ ± ۰/۰۶^{c}	۰/۹۹ ۰±/۰۵^{b}	۰/۹۸ ± ۰/۰۶^{cd}
L1+E1	۴۱/۷۸ ± ۰/۹۱^{a}	۱۲۰/۱۲ ± ۳/۱۷^{b}	۱/۷۵ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۹۵ ± ۰/۰۳^{ab}	۱/۰۵ ± ۰/۰۳
L2+E2	۴۲/۱۶ ± ۰/۸۳^{a}	۱۳۹/۲۱ ± ۵/۹۸^{d}	۱/۹۴ ± ۰/۰۶^{d}	۱/۰۱ ± ۰/۰۶^{b}	۰/۹۱±۰/۰۴^{d}

* حروف غیرهمسان (a, b ,c) در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) بین تیمارها است.

نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نداشت (جدول ۵) لیکن در مورد ماهی‌های تحت تیمار با جیره ترکیبی L1+E1 افزایش معنی‌دار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین در مورد پارامترهای MCV و MCH تغییرات معنی‌داری میان گروه شاهد و هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

پارامترهای رشد: طبق یافته‌های رشد، پارامترهای درصد افزایش وزن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، فاکتور وضعیت (CF)، به‌ترتیب درتیمارهای L2+E2، Bactocell، E2، L2 بیشترین مقادیر و شاخص ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمارهای مذکور کمترین مقادیر را بطور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۶).

بحث

سویه‌های باکتریایی واجد خصوصیات پروبیوتیکی مربوط به محصولات لبنی دارای تاریخچه طولانی مصرف و استفاده بی‌خطر هستند، که از جمله آن‌ها می‌توان به کفیر اشاره کرد (Hosono *et al.*, 1990). شناسایی و جداسازی سویه‌های پروبیوتیکی مربوط به جنس‌های *Lactobacillus* و *Enterococcus* از زمان مصرف انسان از شیر تخمیر شده رایج بوده است، به‌طوری‌که سلامتی و ایمن بودن برخی از گونه‌ها پس از چند دهه استفاده تایید شده است (Soccol *et al.*, 2010). دانه‌های کفیر حاوی مجموعه‌ای از سویه‌های پروبیوتیکی متعلق به جنس‌های لاکتوباسیل‌ها و انتروکوکوسی‌ها است (Rodrigues *et al.*, 2005) که می‌تواند منبع مفیدی برای استخراج سویه‌های جدید پروبیوتیکی باش (Kumura *et al.*, 2004). لیکن پس از شناسایی مولکولی جدایه‌ها بایستی ویژگی‌های پروبیوتیکی و سلامتی آنها با استفاده از تست‌های

برون‌تنی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد (Saarela *et al.*, 2000; Mercenier *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر سویه‌های *L. farraginis* و *E. durans* به‌ترتیب به فرم‌های باسیل و کوکسی، هر دو گرم مثبت، در شرایط بی‌هوازی و به‌دنبال فرایند تخمیر دانه‌های کفیر در شیر، جداسازی شدند. مشابه با پژوهش انجام شده سویه‌های *L. farraginis* و *L. para farraginis* از نوعی نوشیدنی سنتی بنام شوچو حاصل فرایند تخمیر عصاره برنج جدا شد (Endo and Okada, 2007). همچنین در مطالعه دیگری سه سویه *E.durans* از نوعی کفیر ترکی (Turkish kefir) جداسازی شدند (Yuksekdag *et al.*, 2004)، اخیراً نیز *E. durans* از کفیر انکوبه شده در شیر بز نیز جداسازی شده است (Aloklah *et al.*, 2017). از طرفی طبق یافته‌های تحقیق حاضر دو سویه جدا شده از کفیر فاقد هر گونه فعالیت‌های همولیز در محیط کشت بلاد آگار بودند، همچنین تست فعالیت کاتالاز و اکسیداز آن‌ها نیز منفی ارزیابی شد. در یک مطالعه مشابه سویه *L. kefiri* جدا شده از دانه‌های کفیر فاقد هرنوع فعالیت همولیتیک گزارش شد (Carasi *et al.*, 2014). برخلاف نتایج پژوهش حاضر فعالیت همولیتیک نوع آلفا و بتا برای برخی از سویه‌های *E. durans* در محیط کشت بلاد آگار گزارش شده است (Collins *et al.*, 1984). از طرفی پژوهش‌هایی نیز عدم فعالیت همولیتیک را برای سویه *E. durans* بیان کرده‌اند (Foulquie *et al.*, 2006; Pieniz *et al.*, 2014)، که نتایج متناقض مذکور احتمالاً به‌دلیل تنوع زیاد سویه‌های این گونه و تفاوت در منابعی است که سویه‌ها از آن جداسازی شده اند، چرا که *E. durans* از جمله گونه‌هایی است که بیشترین فراوانی را در بین سایر گونه‌های *Enterococcus* به‌خود اختصاص داده است (Morandi *et al.*, 2006). از سوی دیگر مشابه با نتایج حاصل از پژوهش پیشرو *L. farraginis* و *E. durans* هر دو کاتالاز و اکسیداز منفی گزارش شدند (Devriese *et al.*, 2002; Endo and Okada, 2007). از یافته‌های دیگر مطالعه حاضر مقاوم بودن سویه‌ها به شرایط اسیدی دستگاه گوارش، آنزیم‌های پپسین و تریپسین شیره معده براساس استاندارد ملی ایران (شماره ۱۹۴۵۹) بود (ISIRI, 2012). همچنین طبق استانداردهای FIL/IDF، FAO/WHO و CODEX شمار قابل قبول کلنی‌های سویه‌های پروبیوتیکی برای مصرف موجودات زنده نبایستی از لگاریتم $۱۰^{۶}$ (کلنی/میلی لیتر) کمتر باشد (Samona and Robinson, 1991; Talwalkar and Kailasapathy, 2004; Roy, 2005). از طرفی سویه‌ها در مواجهه با غلظت ۰/۱۵ درصد از نمک‌های صفراوی رشد کردند، در حالی‌که غلظت ۰/۳ درصد از بایل موجب توقف رشد سویه‌ها شد. طی یک تحقیق مشابه سویه‌های جدا شده از دانه‌های کفیر شامل *L. acidophilus*، *L. plantarum*، *L. kefiri* و *L. kefiranofaciens* مقاومت بالایی را در شرایط محیط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی از خود نشان دادند (Zheng *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2017). همچنین نتایج مطالعات دیگری نیز نشان داد سویه *E. durans* جدا شده از محصولات لبنی در مواجهه با شرایط اسیدی و آنزیم‌های معده و همچنین نمک‌های صفراوی توانایی رشد و زنده مانی را دارد (Pieniz *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016). از جمله خصوصیات مهم سویه‌های پروبیوتیکی که موجب تثبیت و ماندگاری آن‌ها در دستگاه گوارش می‌شود توان آبگریزی آن‌ها است (Nikoskelainen *et al.*, 2001). بررسی درصد هیدروفوبیسیتی سویه‌ها در شرایط برون‌تنی بیش از ۵۰ درصد ارزیابی شد، به‌طوری‌که سطح آبگریزی سویه L (۷۲/۴۷ درصد) و سویه E (۵۱/۴۲ درصد) ثبت گردید. به‌طور کلی هردو سویه با توان آبگریزی بالای ۵۰ درصد سطح مناسبی از چسبندگی به مخاط روده را نشان دادند. در تایید نتایج مذکور طی مطالعاتی *L. farraginis*، *L. plantarum*، *L. kefiri* و *L. acidophilus* سطح بالایی از چسبندگی را در محیط کشت به اپیتلیال دستگاه گوارش نشان دادند (Zheng *et al.*, 2013; Thamacharoensuk *et al.*, 2017). همچنین توان آبگریزی *L. kefiranofaciens* XL10 جدا شده از کفیر تبت به میزان ۷۹/۹ درصد گزارش شد (Xing *et al.*, 2017). از طرفی طی یک بررسی سویه‌های *E. durans* جدا شده از فراورده‌های شیر سطوح پایینی از توان آبگریزی را در محیط کشت نشان دادند (Guo *et al.*, 2016). در مجموع

می‌توان گفت درصد آبگریزی سویه‌های E و L نشان دهنده امکان اتصال مناسب آن‌ها به مخاط روده ماهی‌ها و کاهش دفع آن‌ها به همراه مدفوع است. از یافته‌ها دیگر این پژوهش، مشاهده فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های L و E علیه دو پاتوژن مهم مزارع پرورشی قزل آلا یعنی سویه‌های *L. garvieae* و *A. hydrophil* در شرایط آزمایشگاهی بود، ولی میزان این فعالیت علیه سویه *S. iniae* ضعیف ارزیابی شد. طی مطالعات پیشین مهار رشد باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و منفی توسط جنس‌های *Lactobacillus* و سویه *E. durans* جدا شده از کفیر گزارش شده است (Zanirati *et al.*, 2014; Carasi *et al.*, 2014). فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های L و F در تحقیق حاضر احتمالاً به‌دلیل ترکیبات آنتی باکتریال تولید شده توسط آن‌ها است. زیرا متابولیت‌های حاصل از عملکرد سویه‌های LAB در کفیر مانند اسیداستیک، اسیدلاکتیک، اتانول، دی‌استایل، پپتیدها و باکتریوسین‌ها با اثرات آنتی باکتریال خود می‌توانند علیه باکتری‌های بیماری‌زا عمل کنند (Jamuna and Jeevaratnam, 2004).

فاکتورهای خونی به‌عنوان یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن ماهیان می‌تواند متاثر از رژیم غذایی و وضعیت فیزیولوژیک آن‌ها باشد، بر این اساس بررسی مقادیر طبیعی پارامترهای خونی و چگونگی تغییرات آن‌ها از ابزارهای مهم تشخیص سلامت عمومی ماهی‌ها محسوب می‌شود (Bandyopadhyay and Mohapatra, 2009). در پژوهش انجام شده تغذیه بچه ماهی‌های قزل‌آلا با مکمل‌های L2+E2، Bactocell، L2 وE2 موجب افزایش معنی‌دار مقدار شاخصه‌های خونی RBC، Ht، Hb و MCHC در انتهای دوره تیمار شد. یافته‌های از تحقیق پیشرو همسو با نتایج حاصل از افزودن پروبیوتیک *E. casseliflavus* به جیره بچه ماهی‌های قزل‌آلا بود (Safari *et al.*, 2016). همچنین استفاده از باکتری *L. acidophilus* در جیره گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) موجب بهبود شاخص‌های خون‌شناسی شد (Al-Dohail *et al.*, 2009). در مطالعه مشابه دیگری بهبود برخی از پارامترهای خونی به دنبال استفاده از سویه پروبیوتیکی *L. plantarum* در قزل آلای رنگین کمان مشاهده شد (قلجایی‌فرد و همکاران، ۱۳۹۴)، ولی بر خلاف نتایج فوق، در مطالعه دیگری استفاده از این سویه در جیره قزل‌آلا بر سطح شاخصه‌های خونی تاثیر معنی‌داری نداشته است (Yazici *et al.*, 2015). نتایج متفاوت بیان شده طی پژوهش‌های پیشین در مورد پارامترهای خونی، احتمالاً به‌دلیل تفاوت در شرایط محیط پرورش، نوع گونه ماهی، سویه پروبیوتیکی افزوده شده به جیره، سن، طول دوره آزمایش و همچنین میزان دوز بکار رفته در جیره است، که همگی از عوامل تاثیرگذار بر شاخصه‌های خونی هستند. در پژوهش حاضر افزایش سطح شاخصه‌های RBC، Ht، Hb و MCHC ممکن است به‌واسطه تاثیر فزاینده سویه‌های پروبیوتیکی بر روند خونسازی باشد. با توجه به نقش پروبیوتیک‌ها در تولید ریزمغذی‌های مهمی مانند ویتامین‌ها، از جمله ویتامین‌های گروه B و ترکیبات مغذی دیگر مانند اسید فولیک که نقش اثبات شده‌ای در تکثیر و بلوغ سلول‌های خونی دارند (Balcazar *et al.*, 2006) می‌توان این موضوع را توجیه کرد. از نقطه نظر دیگر باید توجه داشت که افزایش میزان هماتوکریت پس از گذشت ۴۵ روز از تغذیه ماهی‌ها توسط خوراک حاوی سویه‌های جدا شده از کفیر از نشانه‌های بی‌خطر بودن آن‌ها و همچنین نقش آن در بهبود سلامتی است زیرا کاهش هماتوکریت عموماً در ماهی‌های تحت استرس طولانی مانند عفونت یا بی-اشتهایی و سوء تغذیه قابل مشاهده است (Aly *et al.*, 2008a). همچنین ارتقاء سطح شاخصه‌های خونی یاد شده احتمالاً به‌دلیل نیاز اکسیژنی بالاتر ماهی‌های تحت تیمار است، که ممکن است در ارتباط با افزایش میزان متابولیسم، سوخت و ساز و در نهایت افزایش رشد بیشتر ماهی‌ها باشد. بر اساس مطالعه‌ای افزایش معنی‌دار فاکتور MCHC در خون می‌تواند نشان دهنده افزایش شاخص هموگلوبین بوده که اکسیژن‌رسانی بیشتری را برای بافت‌ها و اندام‌های فراهم آورده و در نتیجه موجب بهینه‌تر شدن متابولیسم سلولی شده و زمینه رشد مطلوب‌تر اندام‌ها را فراهم می‌آورد (Aly *et al.*, 2008b). همچنین در این تحقیق ارتقاء شاخص هماتوکریت (Ht) ممکن است ناشی از افزایش جذب آهن در روده به‌دنبال افزایش حضور سویه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها در

روده و تغییر pH این محیط باشد. از طرفی ممکن است نوسانات فیزیکو شیمیایی محیط یا تغییرات فیزیولوژیک ماهی موجب تغییر در پارامترهای خون شده باشند که این موضوع نیاز به بررسی‌ها و آزمایشات بیشتری دارد.

از دیگر یافته‌های این پژوهش افزایش مقادیر پارامترهایی چون درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، و فاکتور وضعیت در ماهی‌های تغذیه شده با L2+E2، Bactocell، E2 و L2 در مقایسه با گروه شاهد و سایر گروه‌ها بود. نتایج گویای آن است که بکارگیری دوز بالاتر سویه‌ها 10^8 و ترکیبی از مکمل‌ها (E2+L2) در جیره موجب ارتقاء پارامترهای رشد شده است. از سوی دیگر ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای فوق نیز کمترین مقدار را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. در مطالعات پیشین اثرات سودمند مربوط به بهبود عملکرد رشد پس از افزودن دانه‌های کفیر به جیره ماهیان پرورشی گزارش شده است (Uluköy *et al.*, 2017; Van Doan *et al.*, 2017). مشابه با نتایج به‌دست آمده افزودن *L. acidophilus* به جیره گونه‌ای از گربه ماهیان افزایش پارامترهای SGR،FCR و افزایش BWI را درپی داشته است (Al-Dohail *et al.*, 2009). همچنین تأثیر رژیم غذایی حاوی ترکیبی از سویه‌های *Bacillus subtilis*، *E. faecium* و *P. acidilactici* به جیره قزل آلا موجب بهبود عملکرد رشد و راندمان تغذیه‌ای شده است (Giannenas *et al.*, 2015). براساس مطالعات پیشین پروبیوتیک‌ها با تاثیرات مثبت بر عملکرد گوارش از جمله بهبود در هضم و جذب مواد مغذی، افزایش میکروبیوتای مفید روده، افزایش اشتها، بهبود و اصلاح FCR موجب افزایش رشد ماهی‌ها می‌شوند (Ringo and Cratesoup, 1998; Panigrahi *et al.*, 2005). براساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان چنین اذعان داشت که سویه‌های جدا شده از کفیر ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسب شامل مقاومت به شرایط اسیدی، شیره معده و نمک‌های صفراوی را داشته و از توان آبگریزی قابل قبولی برای ماندگاری در لومن گوارشی برخوردار بوده، همچنین فعالیت آنتاگونیستی مناسبی در مواجهه با برخی پاتوژن‌های ماهی از خود نشان داده است. از طرفی افزودن دوزهای بالای سویه‌ها (LF2 و ED2) و شکل ترکیبی آن‌ها (LF2+ED2) به جیره ماهی قزل آلا موجب ارتقاء و بهبود سطح فاکتورهای هماتولوژی و رشد گردید. به‌طور کلی هر دو سویه کاندیدای پروبیوتیکی مناسبی برای افزودن به جیره گونه پرورشی مذکور به‌نظر می‌رسند، با این وجود مطالعات بیشتری در زمینه آزمون‌های *In Vitro* و *In Vivo* بایستی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب گرنت پژوهشی دانشگاه شیراز و با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و همچنین با بهره‌مندی از تجهیزات آزمایشگاهی گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام پذیرفت.

منابع

قلجایی فرد ا.، خارا ح.، شناور ماسوله ح. ۱۳۹۴. تأثیر باکتری (*Lactobacillus plantarum*) جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استان گیلان بر شاخصهای خونی و ایمنی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان .فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری، جلد ۱، شماره ۳، صفحات:۶۱- ۶۸ .

Adeyemo O.K. 2007. Haematological profile of Clarias gariepinus (Burchell, 1822) exposed to lead. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 7, 163-169.

Al-Dohail M.A., Hashim R., Aliyu-Paiko M. 2009. Effects of the probiotic, Lactobacillus acidophilus, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research* 40, 1642-1652.

Aloklah B.A., AlDeen R.A.B., Alsha'ar I.O.A. 2017. Microbial composition of kefir produced by a novel method in Syria. *International Journal of ChemTech Research* 10, 215-222.

Aly S.M., Abd-El-Rahman A.M., John G., Mohamed M.F. 2008a. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277, 1-6.

Aly S.M., Mohamed M.F., John G. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* 39, 647-656.

Atalan G., Clhan M., Demirkan I., Onder F., Yaman H., Suzmen M. 2003. Effect of topical kefir application on open wound healing an *in vivo* study. *Veterinary Medicine, Kafkas University* 9, 43-47.

Balcazar J.L., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173-186.

Balcazar J.L., Vendrell D., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Girones O., Muzquiz J.L. 2008. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic. Compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 122, 373-380.

Balouiri M., SadikiI M., Ibnsouda S. 2016.Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.

Bandyopadhyay P., Das Mohapatra P.K. 2009. Effect of a probiotic bacterium Bacillus circulans PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of Catla catla (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 467-478.

Benfey T.J., Sutterlin A.M. 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, Salmo salar. *Journal of Fish Biology* 24, 333-338.

Bertazzoni Minelli E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O. 2004. Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* 14, 723-736.

-Blaxhall P.C., Daisley K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5, 771-781.

Bolla P.A., Carasi P., Bolla Mde L., De Antoni G.L., Serradell Mde L. 2013. Protective effect of a mixture of kefir isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of Clostridium difficile infection. *Anaerobe* 21, 28-33.

Brown B.A. 1988. Hematology: Principles and Procedures. In: B.A Brown (ed.), Routine hematology procedures, Leo and Febiger, Philadelphia, PA. pp: 7-122.

Carasi P., Jacquot C., Romanin D.E, Elie A.M., De Antoni G.L., Urdaci M.C., Serradell M.A. 2014. Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir. *International Dairy Journal* 39, 193-200.

Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E., Kilpper-Balz R., Schleifer K.H. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casselipavus* norn. rev., comb. nov.; *E. durans* norn. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. Nov. *International Journal* of Systematic *Bacteriology* 34, 220-223.

Devriese L.A., Vancanneyt M., Descheemaeker P. 2002. Differentiation and identification of Enterococcus durans, E. hirae and E. villorum. *Journal of Applied Microbiology* 92, 821-7.

Endo A., Okada S. 2007. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 708-712.

Fanouraki B.P., Divanach M., Pavlidis M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red progy (*Pargrus pagrus*). *Aquaculture* 265, 294-304.

Fioramonti J.V. Theodorou L. Bueno B. 2003. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17, 711–724.

Foulquie Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1-24.

Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *The International Journal of Food Microbiology* 151, 125-140.

Giannenas I., Karamaligas I., Margaroni M., Pappas I., Mayer E., Encarnação P., and Karagouni E., .2015.Effect of dietary incorporation of a multi-strainprobiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 41, 119-128.

Goldberg S., Doyle R.J., Rosenberg M. 1990. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers.

Kumura H., Tanoue Y., Tsukahara M., Tanaka T., Shimazaki K. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science* 87, 4050-4056.

Larsen H.N.1964. Comparison of Various Methods of Hemoglobin Determination on Catfish Blood. *The Progressive Fish-Culturist* 26, 11-15.

Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Ruas-Madiedo P., Paschoalin V.M.F, Mayo B., Delgado S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science* 98, 3622-3632.

Li Z., Li G., Liu H., Zhao J., Jing Y., Yang F. 2012. The analysis of the impacting factors of probiotics on immune responses. *African Journal of Microbiology Research* 6, 2735-2743.

Liu W., Pang H., Zhang H., Cai Y. 2014. Biodiversity of lactic acid bacteria.In: Zhang H., Cai Y. (eds.), in Lactic Acid Bacteria, Springer, Berlin. pp: 103-203.

Lazado C.C., Caipang C.M. 2014. Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod Gadus morhua. *The Journal of Applied Microbiology* 116, 990-998.

MacFaddin J.F. 2000. Catalase-peroxidase tests. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp: 78-97.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15611-15616.

Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3, 208-218.

Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M.E. 2008. Physiological and functional properties of probiotics. *International Dairy Federation* 429, 2-6.

Mohapatra S., Chakraborty T., Prusty A.K., Das P., Paniprasad K. 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of Rohu, Labeo rohita fingerling: Effects on growth, nutrient digestibility and retention, *Journal of Bacteriology* 172, 5650-5654.

Golowczyc M.A., Gugliada M.J., A., Hollmann L., Delfederico G.L., Garrote, A.G., Abraham L., Semorile G., De Antoni. 2008. Characterization of homo-fermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of* Dairy *Research* 75,211-217.

Gopal A., Shah N.P., Roginski H. 1996. Bile tolerance, taurocholate and cholesterol removal by Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. *Milchwissenschaft* 51, 619-622.

Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Huo G. 2016. Probiotic properties of Enterococcus strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microbial Biotechnology* 9, 7377-745.

Huys G., Botteldoorn N., Delvigne F., De Vuyst L., Heyndrickx M., Pot B., et al. 2013. Microbial characterization of probiotics–advisory report of the working group “8651 probiotics” of the Belgian superior health council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research* 57, 1479-1504.

Hosono A., Tanabe T., Otani H. 1990. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft* 45, 647-651.

Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2014. Probiotic microorganisms-Specifications and test methods. Iranian National Standard No. 19459. (In Persian)

John G., Day J.G., Stacey G.N. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2th (ed). Humana Press Inc. pp: 21-30.

Jamuna M., Jeevaratnam K. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocin. *Journal of General and Applied Microbiology* 50, 79-90.

Krieg N.R, Padgett P.J .2011. Phenotypic and physiological characterization methods. In: Rainey F., Oren A (eds.), Taxonomy of prokaryotes, vol. 38, Methods in microbiology. Elsevier, Amsterdam. pp: 15-60.

Klayraung S., Viernstein H., Sirithunyalug J., Okonogi S. 2008. Probiotic properties of lactobacilli isolated from thai traditional food. *Scientia Pharmaceutica* 76, 485-503.

Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.

Safari R., Adel M., Lazado C.C., Caipang M.C.A., Dadar M. 2016. Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against Streptococcus iniae infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish and Shellfish Immunology* 52, 198-205.

Samona A., Robinson R.K. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. International *Journal of Dairy Technology* 44, 64-66.

Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Spier M.R., Medeiros A.B.P., Yamaguishi C.T., Lindner J.D., Pandey A., Soccol V.T. 2010. The potential of probiotics. *Food Technology and Biotechnology* 48, 413-434.

Suslow T.V., Schroth M.N., Isaka M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72, 917-918.

Suzer C., Çoban D., Kamaci H.O., Saka Ş., Firat K., Otgucuoğlu Ö. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280,140-145.

Talwalkar A., Kailasapathy K. 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* casei complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal* 14, 143-149.

Thamacharoensuk T., Taweechotipatr M., Kajikawa A., Okada S., Tanasupawat S. 2017. Induction of cellular immunity interleukin-12, antiproliferative effect, and related probiotic properties of lactic acid bacteria isolated in Thailand. *Annals of Microbiology* 67, 511-517.

Uluköy G., Kubilay A., Guzel-Seydim Z., Gumus E., Güney S., Kok-Tas T., Metin S., Diler O. 2015. Effect of storage temperature on beneficial microbial load in rainbow trout feed supplemented with kefir. *The Indian Journal of Fisheries* 62, 137-

digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition* 18, 1-11.

Morandi S., Brasca M., Andrighetto C., Lombardi A., Lodi R. 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal* 16, 867-875.

Nikoskelainen S., Salminen S., Bylund G., Ouwehand A.C. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2430-2435.

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

Panigrahi A., Kiron V., Puangkaew J., Kobayashi T., Satoh S., Sugita H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 243, 241-254.

Pieniz S., Andreazza R., Anghinoni T., Camargo F., Brandelli A. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus durans strain LAB18s. *Food Control* 37, 251-256.

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

Rodrigues K.L., Rita L., Caputo G., Tavares J.C., Evangelista J. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal* of *Antimicrobial Agents*, 25, 404-408.

Roman L., Real F., Sorroza L., Padilla D., Acosta B., Grasso V., Bravo J., Acosta F. 2012. The in vitro effect of probiotic Vagococcus fluvialis on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology* 33, 1071-1075.

Rosi J., Rossi J. 1978. I Microrganismi del kefir: I fermenti lattici. Scieza e Tecnica Lattiero-Casearia. 29, 291-305.

Roy D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait, Dairy Science and Technology*, 85, 39-56.

139.
Uluköy G., Metin S., Kubilay A., Güney Ş., Yıldırım P., Güzel-Seydim Z. 2017. TheEffect of Kefir as a Dietary Supplement on Nonspecific Immune Response and DiseaseResistance in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). *Journal of the World Aquaculture Society* 48, 248-256.

Unal B.Ü., Arslanoglu A. 2013. Phylogenetic identification of bacteria within kefir by both culture-dependent and culture-independent methods. *African Journal of Microbiology Research* 36, 4533-4538.

Van Doan H., Hoseinifar S.H., Tapingkae W., Khamtavee P. 2017. The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 62, 139-146.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655-671.

Wahli T., Verlhac V., Griling P., Gabaudan J., Aebischer C. 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). *Aquaculture* 225, 371-386.

Walker D.K., Gilliland S.E. 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76, 956-961.

Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Skov Guldager H., Tamime A.Y. 2006. Fermented Milks. In: A.Y Tamime (ed.), Production of Kefir, Koumiss and Other related Products, Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp: 174-216.

Xing Z., Tang W., Geng W., Zheng Y., Wang Y. 2017. In vitro and in vivo evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefiranofaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 2467-2477.

Wang Y., Zhang H., Zhang L., Liu W., Zhang Y., Zhang X., Sun T. 2010. In vitro assessment of probiotic properties of Bacillus isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 1369-1377.

Yazici I.S., Hisar O., Yilmaz S., Yigit M. 2015. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal water temperature. *Marine Science and Technology Bulletin* 4, 21-28.

Yuksekdag Z.N., Beyatli Y., Aslim B. 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, 663-667.

Zanirati D.F., Abatemarco Junior M., Sandes S., Nicoli J., Alvaro C.N., Neumann E. 2014. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 24, 70-76.

Zheng Y., Lu Y., Wang J., Yang L., Pan C., Huang Y. 2013. Probiotic Properties of Lactobacillus Strains .Isolated from Tibetan Kefir Grains. *Plos One* 8, e69868.

Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from kefir and its effect on some hematological and growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*)

Mohsen Ali[1], Siyavash Soltanian[*1], Ali Taheri Mirghaed[*2], Mostafa Akhlaghi[1], Seyed Hossein Hoseinifar[3], Atefeh Esmailnejad[4]

[1]Department of Aquatic Animal Health and Diseases, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[2]Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[4]Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran, Iran.

*Corresponding authors: siyavashsoltanian@yahoo.com, mirghaed@ut.ac.ir
Received: 2019/6/10 Accepted: 2019/12/27

Abstract

Kefir grains are a natural source of probiotic strains belonging to the family of lactic acid bacteria. This study aimed to isolate and identify the strains of lactic acid bacteria in kefir. In addition, to evaluating their probiotic properties, the effect of their oral administration on some hematological and growth parameters in rainbow trout was also investigated. The findings indicated the isolation and identification of *Lactobacillus farraginis* and *Enterococcus durans* strains, which showed important characteristics of probiotic strains, such as resistance to acidic conditions, gastric juice and bile salts, as well as good hydrophobicity and antagonistic activity against some pathogenic strains. A total of 480 fish with an average weight of 41.9±4.2 g in a completely random design, divided into 8 groups of 20 specimens in three replications. Control treatment (basal diet), L1 and E1 treatments, respectively receiving (basal diet + *L. faraginis*) and (basal diet + *E. durans*) dose of 10^7 Cfu/g; treatments L2 and E2 receiving dose of 10^8 (CFU/g); the combined treatments (L1+E1) 5×10^6 and (L2+E2) 5×10^7 (CFU/g) and Bactocell tretment as a positive control (basal diet + *Pediococcus acidilactici lactis*) 10^{10} (Cfu/g). Sampling of treatments after 45 days from the beginning of the experiment was done. According to the findings, that total red blood cells, hematocrit, hemoglobin level, mean hemoglobin concentration and growth parameters including BWI, SGR and CF were significantly ($P<0.05$) increased in L2+E2, Bactocell, L2, and E2 treatments, Whereas, the decrease in FCR in these groups was evident compared to control on. The strains appear to be suitable probiotic candidates for adding to the rainbow trout diet, but this requires further in vitro and in vitro studies.

Keywords: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Kefir, Probiotics, Rainbow trout.