تاثیر مصرف خوراکی شکل میکروانکپسوله *Enterococcus faecium* بر روی فاکتورهای سلامت، رشد، تغذیه و فلور باکتریایی روده در قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

آرمین عابدیان امیری[۱]، قباد آذری تاکامی*[۱و]، محمد افشار نسب[۱]، ودود رضویلر[۲]

۱. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*Takami85@hotmail.com: نویسنده مسئول

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

چکیده

در این مطالعه تاثیرات دو جیره حاوی پروبیوتیک *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 بر روی فاکتورهای رشد، مصرف غذا، میزان کلونیزه شدن در روده و تاثیراتش بر روی سلامت و زنده‌مانی در قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان مورد مطالعه قرار گرفت. ۲۷۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۳/۸ ± ۳۵/۶ گرم بعد از ۲۰ روز دوره قرنطینه به ۳ گروه کاملاً تصادفی (هر گروه ۹۰ قطعه) در سه تکرار (۳۰ قطعه در هر حوضچه) تقسیم شدند. گروه ۱ شامل جیره حاوی *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 (با لوگ $CFU\ g^{-1}$ ۸/۴) به شکل میکروانکپسوله با آلژینات سدیم و گروه ۲ شامل جیره حاوی *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 (با لوگ $CFU\ g^{-1}$ ۹) به شکل میکروانکپسوله با آلژینات سدیم و گروه شاهد حاوی جیره پایه بودند. در پایان ۴ و ۸ هفته تغذیه، میزان وزن نهایی، طول کل، درصد افزایش وزن، نرخ رشد روزانه، نرخ بازده پروتئینی و درصد بازماندگی در گروه‌های حاوی پروبیوتیک افزایش و ضریب تبدیل غذایی (٪) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. بعد از ۴ هفته تیمار ۲ بالاترین میزان در شاخص‌های رشد، کارایی غذایی و سلامت و افزایش درصد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده در بین تیمارهای پروبیوتیک و گروه کنترل را نشان داد. در ۸ هفتگی در تیمارهای ۱ و ۲ میزان بهبود وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد روزانه، طول کل، نرخ بازده پروتئینی (٪)، درصد باکتری‌های اسید لاکتیک در روده و زنده‌مانی (٪)افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان دادند ($P<0.05$). در ۸ هفتگی، میزان وزن نهایی، درصد افزایش وزن و نرخ بازده پروتئینی (٪) در تیمار ۱ افزایش معنی‌دار و ضریب تبدیل غذایی کاهش معنی را نسبت به تیمار ۲ و گروه کنترل نشان داد ($P<0.05$).

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، انتروکوکوس فسیوم، میکروانکپسوله، شاخص‌های رشد و سلامت، فاکتور تغذیه

مقدمه

جهان در سال ۲۰۱۱ به نقطه عطف جدیدی در تکامل رژیم غذایی انسان رسید. در این سال و برای نخستین بار در تاریخ مدرن، تولید ماهی پرورشی جهان از تولید گوشت گاو پیشی گرفت. این شکاف در سال ۲۰۱۲ افزایش یافته و تولید آبزی‌پروری به ۶۶ میلیون تن رسید (Rumpold and Schlüter, 2013). ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) بعلت داشتن قابلیت بسیار خوب برای پذیرش غذای دستی و پرورش مصنوعی و سرعت رشد قابل قبول به عنوان یک گونه مهم پرورشی در صنعت آبزی‌پروری مطرح است (فدایی‌فرد، ۱۳۹۵). ایران در سال ۲۰۱۳ عنوان بزرگترین تولیدکننده ماهی قزل آلای رنگین کمان در آب شیرین در جهان (با تولیدی معادل ۱۴۳۹۱۷ تن در سال) را به‌خود اختصاص داد (Kalbassi et al., 2013). اما با افزایش مشکلات در مدیریت آب و غذا و همچنین بروز بیماری در صنعت پرورش ماهیان سردآبی کشور تولید به میزان ۱۷۴۰۲ تن در سال ۲۰۱۴ نسبت به سال قبل از آن، کاهش یافت (Baba Alian et al., 2014;

Nafisi Bahabad and Azhar, 2015). این امر در زمانی رخ داد که ایران قصد دارد در راستای برنامه‌ی توسعه‌ی پنج ساله‌ی ششم کشور، میزان تولید قزل-آلای رنگین کمان خود را به ۲۱۲ هزار تن در سال ۲۰۲۰ برساند (FAO, 2016).

امروزه استفاده از زیست‌یارها (probiotics) به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده (Live microorganisms) با یک دوز کافی به‌منظور اعمال تاثیرات مفید در میزبان مورد استقبال عمومی دست اندرکاران صنعت خوراک در دنیا قرار گرفته‌است (FAO, 2006). نحوه عمل زیست‌یارها بر آبزیان به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم می باشد. در حالت اول با تغییر در تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش موجود آبزی، باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شده و با ترشح ویتامین، مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب رشد می گردند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳). در بین زیست‌یازها، *E. faecium* به‌علت توانایی کاهش pH به ۵/۵، تولید پراکسید هیدروژن، توانایی شکستن پروتئین‌ها و تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط روده بسیار سریع در لیست بازار فروش زیست‌یارها وارد شود (Juven and Pierson,1996 ؛ Tomás et al., 2004؛ Cambell-Macbride, 2004).

از طرفی عمل ریزپوشانی (microencapsulation) در صنایع غذایی تکنیکی نسبتاً جدید می‌باشد و هدف از آن حفظ ویژگی‌های زیستی ترکیب در طول پروسه تولید و همچنین در زمان نگهداری تلقی می‌گردد (Zuidam and Nedović, 2010). در این تحقیق سعی شد اثرات خوراکی *Enterococcus faecium* سویه‌ی بومی IR5 به شکل ریزپوشانی شده بر روی شاخص‌های رشد، سلامت و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان در طی هشت هفته تغذیه مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش کار

نوع روش تحقیق

روش تحقیق در این بررسی از نوع مطالعه میدانی (Field Experiment) و آزمایشگاهی(Laboratory Experiment) استفاده شد.

محل انجام تحقیق

مطالعه میدانی این تحقیق در محل کارگاه خصوصی پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (معروف به پرورش ماهی آقای رمضانی) واقع در کیلومتر ۴، جاده آمل- محمودآباد، استان مازندران، ایران انجام-شد. طول و عرض جغرافیایی محل مزرعه فوق‌الذکر به ترتیب، ″۰/۵۱ ′۳۶ °۳۶ شمالی و ″۴۰/۰۶ ′۱۶ °۵۲ شرقی و ارتفاع از سطح دریا معادل ۱۱- متر بود.

مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران انجام پذیرفت.

بررسی عوامل فیزیکی و شیمیایی آب

پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH، هدایت الکتریکی (EC)و غلظت کل ذرات معلق (TDS) با استفاده از دستگاه ملتی پارامتر، دستگاه آنالایزر (HQ40d, Hach®, USA) دو بار در روز در ساعات ۸ صبح و ۸ غروب اندازه گیری ودر فرم‌های مربوطه ثبت گردید.

حیوانات مورد بررسی

ابتدا تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان "*Oncorhynchus mykiss* Walbaum" با وزن متوسط (انحراف معیار±میانگین) ۳/۸±۳۵/۶ گرمی به‌ظاهر سالم انتخاب شدند. سپس جهت سازگاری ماهیان با شرایط جدید محیطی و اطمینان از سالم بودن ماهیان انتخابی به مدت ۲۰ روز با غذای کنسانتره (EXG1) (تولید شرکت کیمیاگستران تغذیه، شهرکرد، ایران) مورد استفاده برای تغذیه ماهیان قزل‌آلا، تغذیه گردیدند. پس از اطمینان از سالم بودن و سازگار شدن (adaptation) ماهیان با

شرایط جدید، در عملیات سایزبندی(sort) تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی پس از زیست سنجی(اندازه گیری طول و وزن) و تعیین زیست توده با میانگین وزنی حدود ۴۵ گرم، به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب شدند و با تراکم ۳۰ قطعه به هر حوضچه بتونی معرفی شدند.

زیست‌یار مورد استفاده

انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 (با شماره ثبت ژن 16s rRNA در ژن بانک: JX154575) استفاده شده در این تحقیق از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران تهیه شد. قابل الذکراست، سویه IR5 از میکروفلور باکتریایی روده تعدادی از قزل‌آلاهای رنگین‌کمان سالم پرورشی در استان مازندران جداسازی شده بود (صفری، ۱۳۹۲) و در گلیسرول ۲۰درصد در فریزر ۲۰- °C نگه‌داری می‌شد. بعد از قرار دادن باکتری فریز شده در دمای آزمایشگاه برای ۲ ساعت مقداری از باکتری را برداشته، در داخل محیط براث MRS(De Man, Rogosa, and Sharpe)(Difco; Detroit, Michigan, USA) تلقیح و در دمای ۳۷°C برای ۲۴ ساعت به‌صورت هوازی در یک انکوباتور شیکردار (shaker incubator) با دور rpm ۱۵۰، گرم‌خانه گذاری شد (Todar, 2008). سپس سلول های *E. faecium* که در محیط کشت MRS براث رشد یافته بودند داخل لوله در یک دستگاه سانتریفیوژ (Centrifugus) (Kokusuan, H-103N, Russia) با دور rpm ۵۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتیگراد قرار داده شدند. ماده رویی دور ریخته شد و سلول های *E. faecium* رسوب کرده در ته لوله با سه بار شستن توسط آب مقطر استریل برداشت و تا زمان استفاده در دمای ۴ °C نگه داری شدند (Daum et al., 1982). غلظت نهایی با رقت cells $۱۰^{۱۰}$ mg^{-1} تهیه گردید.

ریزپوشانی

جهت میکروانکپسوله کردن *E. faecium* سویه IR5 از روش اکستروژن (extrusion) استفاده شده و مواد مورد استفاده جهت انجام این فرآیند نیز شامل آلژینات سدیم (Sodium Alginate) (Na۶O۷H۶C) ٪۲ (Sigma, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)، سرم فیزیولوژی و کلرید کلسیم (CaCl2) ٪۲ و سوسپانسیون انتروکوکوس فسیوم سویه IR5 با لوگ $۷ CFU mL^{-1}$ بودند. ابتدا سوسپانسیونی از باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه شده و جذب نوری آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. ۱۰ سی‌سی از محلول باکتریایی با لوگ CFU $۷ g^{-1}$ در سرم فیزیولوژی تهیه و پس از آن با ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر استریل حاوی آلژینات سدیم ۲٪ (استریل) به خوبی مخلوط گردید. سپس مخلوط تهیه شده با استفاده از سرنگ پلاستیکی با سرنگ G ۱۶، ۵۰ mm به آرامی و قطره به قطره با ارتفاع ۷ سانتی‌متر به ۱۶۰ سی‌سی محلول ۲٪ کلرید سدیم (۰/۱ M) داخل بشر شیشه‌ای استریل که بر روی یک هیتر همزن مغناطیسی (سرعت rmp ۲۰۰) با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۵ دقیقه اضافه گردید. پس از اینکه تمام سوسپانسیون به صورت میکروکپسول درآمد، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بدون حرکت نگه داری‌شد تا رسوب در کف بشر شیشه‌ای ته نشین شود. سپس رسوب توسط محلول سالین (saline solution) شسته شد (Rosas-Ledesma et al., 2011). برای جداسازی ژل میکروانکپسوله شده باکتری در آلژینات، محلول تهیه شده در دور rmp ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. برای جدا کردن کلرید کلسیم اضافه و پیوند نشده، فرآیند شستشو با آب پپتونه ۱٪ استریل انجام شد (همایونی راد و همکاران، ۱۳۹۳، پیمانفر و همکاران، ۱۳۸۷).

اندازه گیری قطر اندازه ذرات

اندازه میکروکپسول‌های حاصله از انتروکوکوس با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری ذرات (Particle Analayzer) مدل Zetrasizer Nano – ZS، ساخت شرکت مالورن (Malvern)، کشور انگلستان در آزمایشگاه گروه فارماسیوتیکس (pharmaceutics)،دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، ساری، ایران تعیین شد (شکل ۲-۴). برای این منظور کپسول‌ها در آب یون‌زدایی شده (Mili Q Milipore USA) با ضریب هدایت ۰/۰۵۴ µs پراکنده و نتایج بر اساس قطر حجم میانگین (VMD) ذرات ± انحراف معیار در حداکثرها (peaks) در درصد شدت‌های (Intensity %) مختلف بیان شد (رضایی مکرم و همکاران،۱۳۸۷).

طراحی آزمایش

در این بررسی از ۱۲ حوضچه بتونی مکعبی شکی به ابعاد ۱ × ۰/۶ متر و به عمق ۶۰ سانتیمتر استفاده شد. ابتد حوضچه‌های بتونی شستشو و با آهک زنده [Ca(OH2)] ضد عفونی شد. سپس جریان آب مورد استفاده به طور یک طرفه و بصورت افشان از بالای حوضچه وارد شده و از خروجی کف و وسط هر حوضچه خارج می‌شد. حجم آب ورودی تمامی حوضچه‌ها با یکدیگر مساوی بود و بطور مداوم در جریان بوده است. مقدار آب ورودی در هر حوضچه برابر ۱ الی ۱/۵ لیتر در ثانیه بود. منبع تامین آب حوضچه‌ها، آب چاه موجود در کارگاه پرورش بود. فاکتورهای فیزیک و شیمیایی آب چاه خصوصی استفاده شده جهت تامین آب حوضچه‌های ماهیان مورد آزمایش توسط دستگاه ملتی‌پارامتر اندازه گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب چاه مورد استفاده در این مطالعه (انحراف معیار± میانگین).

محل	دما (°C)	pH	اکسیژن محلول (mg L^{-1})	هدایت الکتریکی (µs cm^{-1})	کل مواد جامد محلول (mg L^{-1})
چاه خصوصی مزرعه	۱۸/۸±۰/۱	۷/۴±۰/۰	۷/۲±۰/۱	۸۲۰±۰/۰	۴۵۸±۰/۰

اکسیژن محلول :dissolved oxygen ؛ هدایت الکتریکی: electrical conductivity؛کل مواد جامد محلول: total dissolved solids.

ماهیان مورد بررسی به ۲ تیمار (هرکدام سه تکرار) و یک گروه شاهد (سه تکرار) تقسیم شدند (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین وزنی و قد ماهیان قزل آلای رنگین کمان در گروه های مختلف در این تحقیق (انحراف معیار±میانگین).

	تیمارها		
	۱	۲	شاهد
میانگین وزنی (گرم)	۴۴/8±۵۷/۳^{a}	۴۶/۴۳±۶۷/۲^{a}	۶۷/۴۴±۸۳/۳^{a}
میانگین قدی (سانتی متر)	۹۲/۱۵±۰۱/۱^{a}	۷۵/۱۵±۸/۰^{a}	۶۵/۱۵±۷/۰^{a}

تیمارها: ۱-جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز CFU g^{-1} ۱۰^{۸} × ۲/۵ در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز CFU g^{-1} ۱۰^{۹} × ۱ در خوراک.
ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) است.

زیست سنجی (biometry)

زیست سنجی ماهیان به منظور تعیین میزان زیست توده(biomass) و غذای مورد نیاز (در طول ۸ هفته پرورش) هر دو هفته یکبار (روزهای ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ آزمایش) پس از ۲۴ ساعت قطع (deprive)غذا پس از نیمه بیهوشی با عصاره گل میخک (clove oil) (۲۰۰ ppm)، ۱۵ قطعه ماهی در هر تیمار (۵ قطعه در هر تکرار) و شاهد (۵ قطعه در هر تکرار، در کل ۱۵ قطعه) زیست سنجی گردیدند. بطوری‌که در هر بار مشخصات ۴۵ قطعه ماهی با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۱ گرم) توزین و با تخته اندازه گیری ۳۰ سانتیمتری (با دقت ۱ میلی متر) طول آن‌ها اندازه-گیری گردید. اطلاعات حاصله از زیست سنجی در فرم‌های مخصوص که برای این منظور طراحی شده بودند، ثبت شد. ماهیان نیمه بیهوش زییست سنجی شده، پس از اکسیژن دهی فراوان زمانی که هوشیاری خود را بدست آوردند دوباره به حوضچه‌ها مربوطه وارد شدند (Rodas , et al., 2002).

در میانه و انتهای بررسی تلفات دوره محاسبه گردید. همچنین شاخص های رشد، مرفومتریک، تغذیه‌ای و سلامتی؛ شامل وزن اکتسابی (Weight Gain)، درصد افزایش وزن (Percent Body Weight Increase)، نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate)، شاخص وضعیت(Condition Factor) ، نرخ بازده پروتئین (Protein efficiency ratio) ، ضریب تبدیل غذایی (Feed Conversion Rate) و درصد زنده‌مانی (Survival) ماهیان در تیمارهای مختلف آزمایش و شاهد بررسی گردید .به منظور ارزیابی روند رشد، علاوه بر اندازه گیری وزن و طول کل ماهیان، شاخص‌های رشد بر اساس منابع موجود از معادلات ریاضی محاسبه شدند (Samantaray and Mohanty, 1997).

الف) وزن اکتسابی (WG)

$$WG = W_1 (g) – W_2 (g)$$

W_1 = گرم وزن اولیه ماهی ; W_2 = گرم وزن نهایی

ب) درصد افزایش وزن (PBWI)

$$PBWI = [(W_1 (g) – W_2 (g) / W_1 (g)] \times 100$$

W_1 = گرم وزن اولیه ماهی ; W_2 = گرم وزن نهایی

ج) نرخ رشد ویژه (SGR)

$$SGR = [LnW_2 - LnW_1 / Days] \times 100$$

LnW1 = لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی; LnW2 = لگاریتم طلبیعی وزن

Days: طول دوره

د) شاخص وضعیت(CF)

$$CF = [W_1 (g) – W_2 (g) / L^3 (cm)] \times 100$$

W_1 = گرم وزن اولیه ماهی ; W_2 = گرم وزن نهایی; L = طول کل ماهی

ه) درصد زنده‌مانی (Survival)

$$Survival (\%) = (N_1 – N_2) \times 100$$

N_1 = تعداد اولیه ماهی; N_2 = تعداد ماهیان تلف شده

و) نرخ بازده پروتئین (PER)

$$PER = Live WG (g) / Protein intake (g)$$

Live WG = وزن به‌دست آمده در هر ماهی; Protein intake = پروتئین غذای مصرف شده توسط هر ماهی

ز) ضریب تبدیل غذایی (FCR)

$$FCR (\%) = [Live WG (g) / Dry feed eaten (g)] \times 100$$

Live WG = وزن به‌دست آمده در هر ماهی ; Dry feed eaten = غذای خشک خورده شده

نحوه غذا دهی

مقدار غذای روزانه بر اساس جدول استاندارد در نظر گرفته شد (فرزانفر، ۱۳۷۲)، با توجه به اندازه و میانگین وزنی بچه ماهیان و درجه حرارت آب غذا دهی به میزان ۲/۲ درصد وزن توده زنده(از ابتدای دوره پرورش تا انتها)، بصورت دستی و در سه نوبت (در ساعات ۷، ۱۲ و ۱۷) انجام شد. غذای ماهیان بر اساس شماره هر تیمار در ظروف جداگانه و مخصوص نگهداری می شد و هنگام غذادهی با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شده و در سطح آب حوضچه‌ها توزیع گردید. هر حوضچه هر دوهفته هنگام تعیین زیست سنجی (اندازه‌گیری وزن و قد)، حوضچه مورد نظر توسط یک برس مخصوص تمیز کردن سطوح سخت تمیز می شد تا غذای احتمالی مصرف نشده و فضولات از محیط پرورش توسط جریان آب و خروجی کف حوضچه خارج گردد. آنالیز تقریبی خوراک تجاری پایه مصرف شده (EXG1) در جدول ۳ آورده شده‌است.

جدول ۳- آنالیز تقریبی خوراک تجاری پایه مصرف شده در این تحقیق.

خوراک	سایز (سانتیمتر)	پروتئین خام (گرم)	چربی خام (گرم)	فیبر (٪)	رطوبت حداکثر (٪)
EXG1	۴±۰/۳	۳۸	۱۶	۳	۱۰

EXG1: خوراک تجاری EXG1، ساخت شرکت کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران

شمارش کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک در روده در دو نوبت پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم دو ماهی از هر حوضچه (۶ ماهی از هر تیمار) از نمونه‌هایی که خونگیری شده‌بودند به طور تصادفی انتخاب و پس از عملیات بیهوش کردن با گل میخک با یک ضربه به کاسه سر کشته شدند. در یک بشر حاوی الکل اتیلیک (C_2H_5OH) ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند تا سطح بدن ماهیان از آلودگی عاری گردد. سپس ماهیان بر روی یک سینی تشریح استریل در زیر هود آزمایشگاه توسط یک قیچی، پنس و تیغ جراحی استریل کالبدگاشیی شدند. کل روده هر ماهی از محوطه شکمی خارج و از یک سانتیمتری به انتها توسط یک قیچی استریل بریده شد. یک گرم از هر روده در ۰/۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل جداگانه هموژن گردید (Brunt and Austin , 2005). رقت نمونه توسط سرم فیزیولوژی استریل به 10^6 CFU mL^{-1} رسانده‌شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA (tryptic soya agar) (Merck, Germany)داخل پلیت یکبار مصرف استریل به-منظور شمار کل باکتری‌های قابل رشد (total count (TVC: viable) (Merrifield et al, 2010)و ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی MRS آگار برای شمارش تعداد باکتری‌های قابل رشد گروه اسیدلاتیک (MHPRC, 2010) اسپری شد. کلنی-های باکتریایی بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۶ °C به مدت ۴۸ ساعت شمرده‌شدند (Nikoskelainen et al, 2003; Capkin and Altinok, 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحقیق از طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely Randomized (CRD) Design در سه تکرار برای هر تیمار و شاهد استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها پس از تست Shapiro wilk جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و میانگین بدست آمده از هر آزمایش، از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA و جهت اختلاف معنی دار آماری از روش دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ ($P<0.05$) تعیین گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم

افزارهای (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) SPSS 18 و رسم نمودارها به کمک Excel 2010 صورت گرفت. نتایج به‌صورت انحراف معیار±میانگین بیان شد.

نتایج

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

در طول دوره آزمایش در میزان فاکتورهای دما، اکسیژن و pH آب حوضچه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

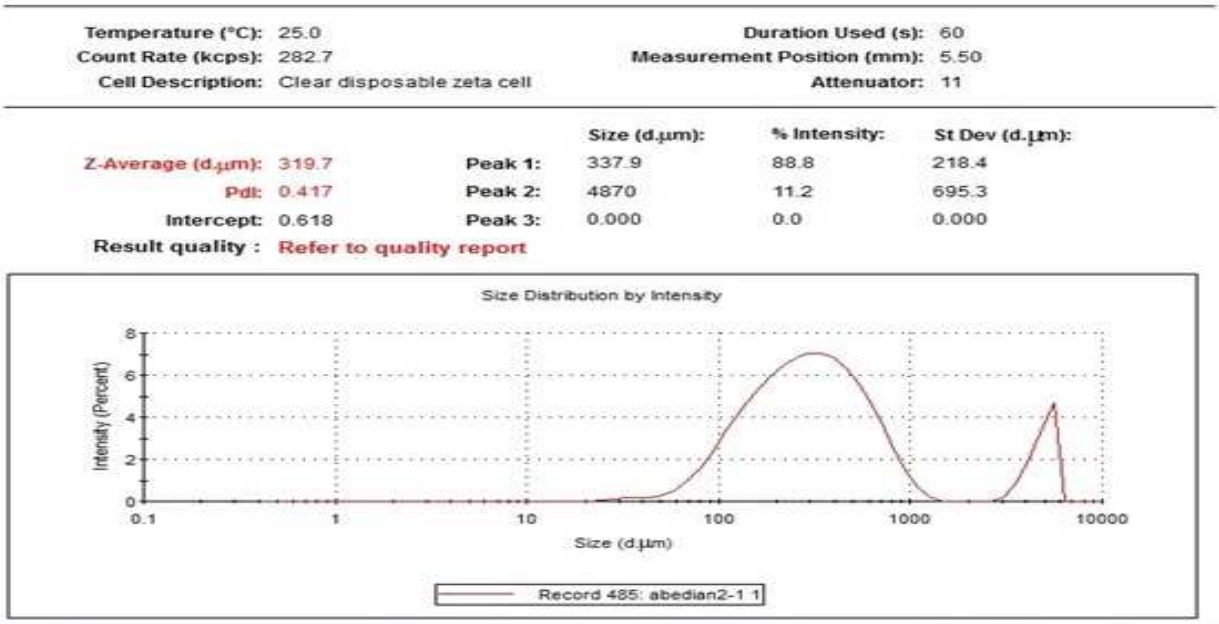
جدول ۴- مقایسه میزان دما، اکسیژن و pH آب حوضچه‌های پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق (انحراف معیار±میانگین).

پارامتر	تیمارها		
	۱	۲	شاهد
دمای‌آب (°C)	۱۸/۹۸±۰/۰۷[a]	۱۹/۰۲±۰/۰۸[a]	۱۸/۹۲±۰/۴۵[a]
میزان اکسیژن($mg\ L^{-1}$)	۸/۱۷±۰/۲[a]	۸/۱۹±۰/۳۴[a]	۸/۱۸±۰/۲۴[a]
pH	۷/۶۷±۰/۰۱[a]	۷/۶۷±۰/۰۲[a]	۷/۶۴±۰/۰۴[a]

تیمارها: ۱-حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ $CFU\ g^{-1}$ در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز ۱×۱۰^{۹} $CFU\ g^{-1}$ در خوراک.
ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) است.

اندازه قطر میکروذرات

بر اساس داده‌های به دست آمده از منحنی توزیع ذرات، قطر ۸۸/۸ ٪ از ذرات میکروانکپسوله پروبیوتیک (تیمار ۱ و ۲) معادل ۳۳۷/۹±۲۱۸/۴ میکرومتر و قطر ۱۱/۲ ٪ از ذرات معادل ۴۸۷۰±۶۹۵/۳ میکرومتر بوند (نمودار ۱).



نمودار۱- پراکنش سایز ذرات میکروانکپسوله شده پروبیوتیک *E. faecium* سویه IR5 بوسیله روش اکستروژن.

شاخص های رشد، مرفومتریک و سلامتی نتایج آنالیز واریانس یک طرف و آزمون دانکن برای میانگین وزن بدست‌آمده، طول کل، نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن، شاخص وضعیت و درصد زنده-مانی در تیمارهای مورد بررسی و شاهد در جدول ۵ ارائه شده‌است.

جدول ۵- مقایسه میانگین شاخص های رشد، مرفومتریک و سلامت در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (در میان دوره و پایان دوره) (انحراف معیار±میانگین).

شاخص	دفعات بررسی	تیمارها		شاهد
		۱	۲	
WG (g)	میان دوره	^{a}۲۱/۲۷±۵/۹۴	^{a}۲۶/۲±۴/۰۴	^{a}۱۹/۷۳±۰/۹۵
TL (cm)		^{a}۱۹/۳۴±۱/۱۷	^{a}۱۹/۵۴±۱/۱۲	^{a}۱۸/۶۲±۱/۰۷
SGR (%)		^{b}۱/۲۱±۰/۳۲	^{a}۱/۴۶±۰/۲۹	^{b}۱/۱۴±۰/۱۱
BWI (%)		^{b}۴۰/۹±۱۶/۷۹	^{a}۵۰/۳۸±۱۳/۵۷	^{b}۳۷/۹۴±۴/۴۸
CF (%)		^{a}۱/۱۱±۰/۰۶	^{b}۰/۹۴±۰/۹	^{a}۱/۰۵±۰/۰۹
Surv. (%)		^{a}۱۰۰±۰/۰	^{a}۱۰۰±۰/۰	^{a}۱۰۰±۰/۰
WG (g)	پایان دوره	^{a}۷۱/۰۸±۲/۳۲	^{b}۵۹/۰۷±۱/۵۱	^{c}۵۲/۸۳±۷/۷۳
TL (cm)		^{a}۲۲/۲۴±۱/۴	^{b}۲۰/۹۸±۱/۰۶	^{b}۱۹/۸۴±۲/۲۵
SGR (%)		^{a}۱/۵۳±۰/۱۳	^{b}۱/۳۶±۰/۰۶	^{c}۱/۰۹±۰/۱۷
BWI (%)		^{a}۱۳۶/۷۵±۱۹/۰۶	^{b}۱۱۳/۹۷±۶/۶۲	^{c}۱۰۱/۵۶±۲۳/۲۹
CF (%)		^{a}۱/۰۷±۰/۰۷	^{b}۱/۰۰±۰/۰۸	^{a}۱/۱۲±۰/۱
Surv. (%)		^{a}۱۰۰±۰/۰	^{a}۱۰۰±۰/۰	^{a}۱۰۰±۰/۰

تیمارها: ۱-جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU g^{-1} در خوراک، ۲-جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز ۱×۱۰^{۹} CFU g^{-1} در خوراک.

WG: وزن بدست آمده، TL: طول کل، SGR: نرخ رشد ویژه، BWI: درصد افزایش وزن، CF: شاخص وضعیت، .Sury: درصد زنده مانی.

ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) است.

فاکتورهای تغذیه

نتایج آنالیز واریانس یک طرف و آزمون دانکن برای میانگین نرخ پروتئینی و ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای مورد بررسی و شاهد در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶- مقایسه میزان میانگین شاخص‌های تغذیه‌ای در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (در میان دوره و پایان دوره) (انحراف معیار±میانگین).

شاخص	دفعات بررسی	تیمار ها		
		۱	۲	شاهد
PER (g)	میان دوره	۲/۴۱±۰/۴۲	۲/۵۷±۰/۶۱	۲/۳۶±۰/۱
FCR (%)		^{b}۱/۰۹±۰/۴۱	^{b}۱/۰۲±۰/۱۴	^{a}۱/۱۶±۲۹/۰۶
PER (g)	پایان دوره	^{a}۲/۲۳±۰/۱۹	^{d}۲/۰۲±۰/۰۵	^{c}۱/۹±۰/۲۸
FCR (%)		^{b}۱/۱۸±۰/۰۹	^{a}۱/۳۱±۰/۰۶	^{a}۱/۳۸±۰/۲

تیمارها: ۱-حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU g^{-1} در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز ۱×۱۰^{۹} CFU g^{-1} در خوراک.

PER: نرخ بازده پروتئینی، FCR: ضریب تبدیل غذایی.

ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) است.

بررسی‌های باکتریایی روده

نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن میانگین لوگ کل باکتری‌های قابل کشت و اسیدلاکتیک در یک گرم روده ماهیان مورد بررسی در این آزمایش در جدول ۷ ارائه گردیده‌است.

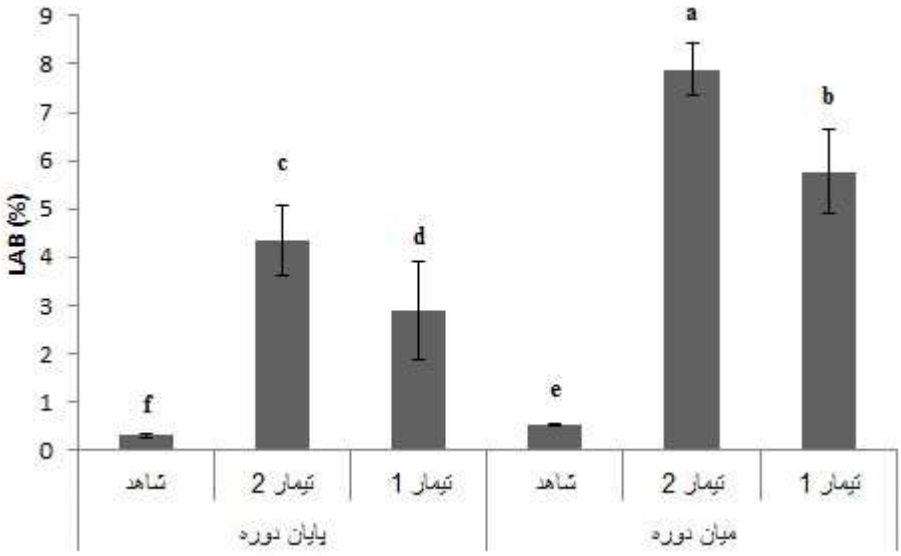
جدول ۷- مقایسه میانگین لوگ کل باکتری های قابل کشت و کل باکتری های اسید لاکتیک در یک گرم روده ماهیان قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف و شاهد (میان دوره و پایان دوره بررسی) (انحراف معیار± میانگین).

شاخص	دفعات بررسی	تیمار ها		
		۱	۲	شاهد
TBC (Log CFU g^{-1})	میان دوره	۷/۸۱±۰/۵۱	۷/۷۳±۰/۳۷	۷/۴۵±۰/۰۷
LAB (Log CFU g^{-1})		۶/۳۷±۰/۶۵	^{a}۶/۴۳±۰/۴۱	^{b}۴/۲۸±۰/۳۶
TBC (Log CFU g^{-1})	پایان دوره	۷/۷۸±۰/۰۸	۷/۷۶±۰/۱	۶/۹۹±۱/۳۲
LAB (Log CFU g^{-1})		^{a}۶/۵۴±۰/۱۴	^{a}۶/۷۱±۰/۰۳	^{b}۴/۳۱±۰/۹۷

تیمارها: ۱-حیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU g^{-1} در خوراک، ۲- جیره حاوی پروبیوتیک بومی میکروانکپسوله *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 با دوز ۱×۱۰^{۹} CFU g^{-1} در خوراک.

TBC: کل باکتری‌های قابل کشت، LAB: کل باکتری‌های اسیدلاکتیک

ارزش‌ها در هر ردیف با علامت‌های مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<0.05$) است.



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد لوگ کل باکتریهای اسیدلاکتیک قابل کشت به کل باکتریهای قابل رشد در یک گرم روده در تیمارهای مختلف طی دو مرحله نمونه برداری (انحراف‌معیار±میانگین).

گروه پروبیوتیک: ۱، جیره حاوی لوگ ۸/۴ CFU g–1 *E. faecium* میکروانکپسوله؛ ۲، جیره حاوی لوگ ۹ CFU g–1 *E. faecium* میکروانکپسوله.

حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد ($P<0.05$).

بحث

در این تحقیق از پروبیوتیک *Enterococcus faecium* با دوزهای مختلف حاوی لوگ ۳ لوگ ۸/۴ و ۹ ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم ۲٪ به همراه گروه کنترل (هر تیمار سه تکرار) برای یک دوره زمانی ۸ هفته ای در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. قابل الذکر است، پروبیوتیک استفاده شده در این تحقیق متعلق به گروه باکتری-های اسید لاکتیک بود (Kongo, 2013). فرایند ریز-پوشانی کردن پروبیتیک‌ها می‌تواند باعث افزایش بقای آنان در زمان نگه‌داری و در طی فرایند عبور از اسید معده و نمک‌های صفراوی در روده کوچک گردد (Cebeci and Gurakan, 2003; Charteries et al., 1998). این نکته قابل توجه است که زنده مانی پروبیوتیک‌ها یک امر مهم در میزان تاثیر آن‌ها بر روی میزان رشد و مقاومت دربرابر میکروب‌های بیماریزاست (Lahtinen et al., 2012). آلژینات کلسیم به میزان گسترده در ریزپوشانی باکتری های لاکتیکی و پروبیوتیک ها به کار رفته است. از مزایای ریزپوشانی با آلژینات می توان به فناوری آسان و سهولت کار، سمی نبودن آن، ارزان بودن و این که به عنوان افزودنی مجاز غذایی شناخته شده است اشاره کرد(Sheu et al., 1393, Allan-Wojtas et al., 2008, Krasaekoopt et al., 2004). به‌طور عمومی محدوده‌ی اندازه‌ی میکروذرات تهیه شده با روش‌های مختلف میکروانکپسوله در محدوده‌ی چندصد میکرومتر گزارش شده‌است. در واقع سایز قطر میکرو ذرات باید کوچک (کمتر از ۱ میلیمتر) باشد و توصیه شده این موضوع در روش کار باید تحت مراقبت قرارگیرد. عموماً سایز قطر میکروذرات تولید شده با استفاده از تکنیک اکستروژن بسیار متفاوت است و به‌طورکلی ذرات زیر ۳۰۰ میکرومتر توصیه نمی شود(Rokka and Rantamäki 2010; Burgain et al., 2011). قابل ذکر است، اندازه‌ی قطر ذرات به عواملی مانند اندازه‌ی قطر نازل قطره چکان و فاصله‌ی نازل تا سطح محلول حاوی

پروبیوتیک بستگی دارد (Ghorbani and Zomorodi, 2015). قطر ذرات با توجه به داده‌های به دست‌آمده از منحنی توزیع ذرات در مطالعه‌ی حاضر، قطر ۸۸/۸٪ ذرات معادل ۲۱/۸±۳۳۷/۹ میکرومتر و قطر ۱۱/۲ ٪ ذرات معادل ۶۹/۵±۴۸۷۰ میکرومتر بودند (نمودار ۱). این نتایج در محدوده‌ی توصیه شده توسط محققین پیشین است (Rokka and Rantamäki 2010; Burgain et al., 2011). با توجه به افزایش معنی‌دار فاکتورهای رشد ($P<0.05$) در تیمارهای حاوی پروبیتیک *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد که فرایند ریزپوشانی تاثیر منفی بر طعم غذا نداشته‌است. این نتایج صحیح بودن فرآیند ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در این تحقیق را تائید می‌کند.

دوز انتخابی پروبیوتیک مصرفی می‌تواند تاثیرات متفاوتی را در واکنش میزبان نسبت به جیره غنی‌شده با پروبیوتیک باعث شود (Nikoskelainen et al., 2001,2003; Panigrahi et al., 2004; Bagheri et al., 2008). Lahtinen و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشتند که دوز مصرف پروبیوتیک بین لوگ ۸ و ۹ در جیره برای بهبود رشد و افزایش ایمنی مناسب است.

مطالعات گذشته نشان داد که مصرف پروبیوتیک‌ها می تواند باعث افزایش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده گردد (Merrifield et al., 2010a,b; Campbell-MaBride, 2004). این امر با نتایج حاصل از این مطلعه سازگار است. سلول‌های *انتروکوکوس فسیوم* دارای پیل (pili) بر روی دیواره‌ی خود هستند (Murray et al., 1990; Van Wamel et al., 2007). پیل‌ها می‌توانند به حرکت و چسبیدن باکتری‌های گرم مثبت به دیواره روده کمک کند و باعث تحریک ایمنی در میزبان گردند (Van Gerven et al., 2011). گروهی از محقیقن در مطالعات جداگانه‌ای نشان دادند که پروبیوتیک انتروکوکوس فسیوم نسبت به پروبیوتیک‌های *B. subtilis* (Panigrahi et al. 2007; Merrifield et al., 2010b) و *B. licheniformis* (Merrifield et al., 2010b)بهتر می تواند با اکولوژی محیط روده ماهی تیلاپیا سازگار شود . با توجه به اینکه مطالعات گذشته نشان دادند که *E. faecium* نسبت به دمای محیط پرورش ماهیان سردآبی (Panigrahi et al., 2007)، pH و نمک‌های صفراوی نسبتاً مقاوم است (Nikoskelainen et al., 2001)و همچنین فرآیند پوشش‌دار کردن می‌تواندباین باکتری مقاومتش نسبت به pH و نمک‌های صفراوی دستگاه گوارش افزایش یافته‌است (Hernández-Carranza et al., 2013). از طرفی کاهش معنی‌داری در درصد باکتری‌های اسیدلاتیک در روده در تیمار ۱ و گروه کنترل نسبت به تیمار ۲ (*E. faecium* با لوگ (CFU g-1)۹ در غذا) مشاهده‌شد ($P<0.05$) که می‌تواند به‌علت بالاتر بودن دوز مصرفی پروبیوتیک *E. faecium* در جیره ماهیان در تیمار ۲ نسبت به تیمار ۱ باشد (Merrifield et al., 2010a,b). علت اینکه باکتری‌های پروبیوتیک قادرند تا بر روی سلول‌های اپیتلیال کلنیزه شوند و جلوی چسبیدن پاتوژن‌ها را به اپیتلیال بگیرند وجود مکانسیمی است در ارتباط پروبیوتیک‌ها و میزبان. تاثیرات ضد چسبیدن پاتوژن‌ها به گیرنده‌های مشابه ممکن است بعلت تولید موسین (mucin)افزایش یابد (Oelschlaeger, 2010). گزارشاتی در مورد این خاصیت ضد چسبندگی موسین در مورد تعداد دیگری از پروبیتکی‌های گروه لاکتوباسیل توسط سایر محققین در محیط آزمایشگاه گزارش شده‌است (Li et al., 2015). هرچند که در مورد Enterococcus به‌ویژه در مورد *E. faecalis* گزارشاتی وجود دارد که باکتری فوق الذکر، بوسیله‌ی تولید glycosidases می تواند باعث کاهش موسین در لایه‌ی موکوسی مخاطی روده شود (Lammers, 2008). اما به‌نظر می‌رسد این امر در مورد *E. faecium* متفاوت باشد. Araújo و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که هیچ یک از *E. faecium* جدا شده از ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان، غذا و محیط پرورش آن ویژگی توانایی مصرف

نمک و کاهش موسین را نداشتند. این با یافته‌های ما در مورد توانایی بیشتر و معنی‌دار چسبندگی *E. faecium* strain IR5 در تیمارهای حاوی پروبیوتیک را نسبت به گروه کنترل در این آزمایش مطابقت دارد ($P<0.05$؛ جدول ۷ و نمودار۲).

تاثیرات عمومی پروبیوتیک‌های اسیدلاکتیک بر روی افزایش مقاومت به استرس در ماهی و سایر حیوانات آبزی در صنعت آبزی‌پروری با هضم مواد غذایی و تولید ویتامین‌ها، کمک به تحریک و افزایش سیستم امینی، شکستن سلولز و سایر پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها به در بسیاری از گزارشات قید شده‌است (Verschuere, 2000; Gatesoupe, 1999; Sun et al., 2011; Mahmoudzadeh et al., 2016).

در واقع خواص پروبیتیک *E. faecium* در توانایی کاهش pH به ۵/۵، تولید پراکسید هیدروژن، توانایی شکستن پروتئین‌ها و تخمیر کربوهیدرات‌ها در محیط روده است. این امر باعث شده تا *E. faecium* بسیار سریع در لیست بازار فروش پروبیوتیک‌ها وارد شود (Juven and Pierson,1996 ؛ Tomás et al., 2004؛Cambell-Macbride, 2004). افزایش معنی‌دار در درصد بازماندگی گروه‌های ۱، ۲ (حاوی پروبیوتیک)نسبت به گروه شاهد بیان‌گر وضعیت سلامت بهتر ماهیان در دسته‌های پروبیوتیک است ($P<0.05$).

Merrifield و همکاران (۲۰۱۰b) درگزارشی افزایش معنی‌دار میزان نرخ رشد روزانه (SGR)و کاهش معنی‌دار FCR را در قزل‌آلای رنگین‌کمان که جیره حاوی پروبیوتیک *E. faecium* (حاوی لوگ CFU g^{-1} ۸/۴ در جیره) برای ۱۰ هفته (روزی دوبار) مصرف می‌کردند را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P<0.05$). این نتایج با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. نتایج این تحقیقی نشان دادند که تنها فاکتور افزایش یافته در گروه کنترل نسبت به‌گروه‌های پروبیوتیک میزان ضریب چاقی در پایان ۸ هفتگی بود. ضریب چاقی رابطه مستقیمی با وزن (گرم) و رابطه معکوسی با اندازه طول (سانتی‌متر) دارد. با توجه به افزایش وزن نهایی در گروه‌های پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل انتظار می رود تا ضریب چاقی در این گروه‌ها بیشتر از کنترل باشد. اما نتایج اندازه طول ماهیان افزایش معنی‌داری در گروه‌های پروبیوتیک مشاهده شد. با نوجه به فرمول محاسبه ضریب چاقی می توان نتیجه گرفت که طول ماهیان تاثیر بیشتری [(طول کل)۳] بر میزان این فاکتور دارد. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج Safari و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد. در نتیجه به نظر می‌رسد افزایش وزن نهایی در گروه پروبیوتیک‌ها بیشتر مروبط به افزایش طول کل ماهیان باشد تا افزایش چاقی در آنان. در مورد تیمار ۲ (جیره حاوی شکل میکروکپسوله *E. faecium* لوگ $CFU\ g^{-1}$ ۹ در جیره) در این تحقیق شاخص‌های رشد (درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، افزایش وزن بدست آمده و نرخ بازده پروتئینی) که در ۴ هفتگی نسبت به تیمار ۱ و گروه کنترل افزایش نشان دادند، اما در ۸ هفتگی نسبت تیمار ۱ کاهش نشان دادند. این امر همراه با افزایش معنی‌دار میانگین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده در تیمار ۲ بعد از ۸ هفتگی بود ($P<0.05$) اما در ۴ هفتگی این تعداد کمتر از ۸ هفتگی محاسبه شد. Ramos و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند یک دوز بالاتر ($CFU\ g^{-1}$ ۱۰۶ × ۱/۶) از یک دوز پائین‌تر($CFU\ g^{-1}$ ۱۰^{۵} × ۸/۶) از چند گونه (*Bacillus* sp., *Pedicoccus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) باعث اختلال در جمعیت میکروبی و تحریک سیستم ایمنی دستگاه گوارش همراه با اتلاف انرژی و مواد مغذی در ماهی قزل آلای‌رنگین کمان می شود. در مطالعه دیگری که توسط Li و همکاران (۲۰۱۲)انجام شد، مشاهده شد که دوز بالاتر *L. rhamnosus* ACTT 7469 ($CFU\ day^{-1}$) ۱۰^{۱۲} در نسبت به دوز $CFU\ day^{-1}$ ۱۰^{۱۰} در جیره) باعث کاهش ایمنی و افزایش اسهال در گوسفند گردید. نتایج این مطالعه نشان می دهد دوز $CFU\ g^{-1}$ ۱۰^{۹} پروبیوتیک میکروانکپسوله *E.*

faecium سویه IR5 برای ۴ هفته می‌تواند تاثیرات مفیدتری در فاکتورهای رشد نسبت به تیمار ۱ (جیره حاوی لوگ ۸/۴ CFU g^{-1} *E. faecium* میکروانکپسوله) و همچنین گروه شاهد داشته باشد و با افزایش روزهای مصرف در ۸ هفتگی این امتیاز خود را نسبت به تیمار ۱ از دست می‌دهد.

در تیمار ۲ (*E. faecium* سویه IR5 با لوگ CFU ۹ g^{-1} در خوراک) هرچند که در هفته‌ی ۴ با بالاترین میزان در شاخص‌های رشد، کارایی غذایی، سلامت و افزایش درصد باکتری‌های اسیدلاتیک در روده در بین تمامی تیمارهای مورد آزمایش در رتبه نخست قرار گرفت، اما با افزایش روزهای پرورش در ۸ هفتگی در تمامی شاخص‌های فوق‌الذکر به رتبه دوم قبل از گروه گنترل نزول کرد. این نتایج با میزان حضور باکتری‌های اسید لاتیک در ۴ و ۸ هفتگی در روده قزل‌آلاهایی که جیره حاوی میکروانکپسوله *E. faecium* در جیره با لوگ CFU g^{-1} ۹ قابل توجیه می‌باشد (Ramos et al., 2015).

Araújo و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که ۱۷ (۲۶/۶ ٪) از ۶۴ انتروکوک (enterococcal) جداسازی شده از قزل‌آلاها نبودند مقاوم یه هیچ یک از آنتی بیوتیک‌ها و فاکتور حدت نداشتند، پس برای استفاده به‌عنوان پروبیوتیک‌ها مناسب هستند. بنابراین *E. faecium* سویه IR5 می تواند برای مصرف مانند یک پروبیوتیک برای قزل‌آلای رنگین کمان امن و مناسب باشد. همچنان که آن از ماهیان سالم جدا شد و گروه های آزمایشی با این میکرواگانیسم‌ها هیچ‌گونه نشان کلینیکی از عفونت یا غیر طبیعی بودن را از خود بروز نداند.

این تحقیق پیشنهاد می کند، *E. faecium* سویه IR5 ریز پوشانی شده باآلژینات سدیم (۲٪) در جیره با لوگ CFU g^{-1} ۹ تنها برای یک دوره زمانی حداکثر ۴ هفته‌ای برای قزل‌آلای های جوان بکار رود و با لوگ CFU g^{-1} ۸ می تواند برای یک دوره طولانی‌تر (۸ هفته) در جیره به‌منظور افزایش سلامت، بهبود تغذیه و افزایش رشد بکار گرفته شود.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از پژوهکشده اکولوژی دریای خزر برای دراختیار قرار دادند *انتروکوکوس فسیوم* سویه IR5 و از رضا صفری برای کمک‌های تکنیکی در این تحقیق صمیمانه تشکر می کنند.

منابع

پیمانفر ش.، کسری کرمانشاهی ر. و فولادی ج. (۱۳۸۷). بررسی خصوصیات دو سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از علوفه سیلوشده ذرت و سبوس برنج و پوشش دادن آنها با پلیمرهای آلژینات و کیتوزان برای افزایش پایداری آنها. مجله علمی-پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)، ۳۵، ۲۲۳-۲۳۲.

رضایی مکرم ر.، مرتضوی س .ع.، نجفی حبیبی م .ب.، شهیدی ف.، خمیری م.، (1387)، اثر میکروانکپسولاسیون آلژینات کلسیم بر قابلیت ، زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 در شرایط شبیه سازی شده معده و روده انسان، هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی مشهد، ایران.

صفری ر. (۱۳۹۲). بررسی امکان تولید پروبیوتیک بمنظور افزایش سیستم ایمنی قزل آلا در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس و مقایسه آن با پروبیوتیکهای وارداتی. گزارش نهایی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ۱۲۲ صفحه.

فدایی‌فرد ف. (۱۳۹۵). قزل‌آلای رنگین‌کمان؛ پرورش، مدیریت بهداشتی، بیماری‌ها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، ۱۶۸ صفحه.

قشقایی ر. و لایق م. (۱۳۸۳). پروبیوتیک‌ها: تکنولوژی نوین در آبزی پروری. نقش مهر، تهران، ۸۳ ص.

همایونی راد ع.، حاجی اقراری ف. و دهقانی س. (۱۳۹۳). بررسی روشهای انکپسولاسیون پروبیوتیکها جهت استفاده در محصولات لبنی. بیست و دومین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی. ۴ صفحه.

Allan-Wojtas P., Hansen L.T., Paulson A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loadedalginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Sci. Technol*. 41, 101-108.

Araujo G.V, Oliveira Junior M,H, Peixoto D.M., Sarinho E.S. (2015). Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. J *Pediatr (Rio J)*.,91, 413-27.

Baba Alian A., Azari Takami G., Abedian Amiri A., Khodadadi A., Keshavarz M., Arabzadeh P., Amiri S. (2014). Investigation the Role of Physical and Chemical Parameters on Yersiniosis Outbreak in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum) Farms in Iran. *WJFMS*, 6 (6), 499-503.

Bagheri T., Hedayati S., Yavari V., Alizade M., Farzanfar A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk. J. Fish. Aquat. Sci., 8: 43-48.

Brunt J., Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28, 693–701.

Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483.

Campbell-McBride, N. (2004). *Gut and Psychology Syndrome*. Cambridge, UK, 264.

Capkin E., Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J Appl Microbiol*., 106, 1147–1153.

Cebeci A, Gurakan A. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus*

and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot*. 59, 1233-1241.

Juven B.J., Pierson M.D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J Food Port*, 59, 1233-1241.

Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E., Salari-Joo H. (2013). A Review on Aquaculture Development in Iran, *ECOPERSIA*, 1, 2.

Kongo J.M. (2013) Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments, chapter 1.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 14:737–743.

Lahtinen S.J., Forssten S., Aakko J., Granlund L., Rautonen N. Salminen S., Viitanen M., Ouwehand, A.C. (2012). Probiotic cheese containing *Lactobacillus rahmnosus* HN001 and lactobacillus acidophilus NCFM® modifies subpopulations of fecal *lactobacilli* and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age (Dordr)*, 34, 133-143.

Lammers M. (2008). Physiology of *Enterococcus faecalis* and *faecium*. Master Immunity and Infection thesis, Department of Medical Microbiology, University of Utrecht, Netherlands, p, 26.

Li H., Limenitakis J.P., Ganal S.C., Macpherson A.J. (2015). Penetrability of the inner mucus layer: who is out there?. *EMBO reports*,16, 127-129.

Li X.Q., Zhu, Y. H., Zhang, H.-F., Zhu Y.H., Yue Y., Cai Z.X. et al. (2012). Risks Associated with High-Dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* Model of Piglet Diarrhoea: Intestinal Microbiota and Immune Imbalances. *PLoS ONE*, 7, e40666.doi:10.1371/journal.pone.0040666.

plantarum strains. *Food Microbiol*, 20, 511–518.

Clifford H., (2013). "Feeding the Future with Genetically Modified Foods", Final record, Biomarine business convention, Halifax world trade and convention center, Halifax, Nova Scotia, Canada, p: 15.

Charteris W.A., Kelly P.M., Morelli, L., Collins J.L. (1998). Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gasrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol*., 84, 759-768.

Daum G., Böhni P.C., Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *JBC*, 257, 13028-13033.

FAO (2006). Probiotics in food: health and nutrition properties and guidelines for evaluation- FAO Food and Nutrition, p: 85.

FAO (2016). [Online]. Available: http://www.fao.org/fishery/facp/IRN/en#CountrySector-ProductionSector.

Gatesoupe F. J., (1999). The use of probiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture*. 180: 147-165.

Ghorbani H., Zomorodi S. (2015). Designing and Manufacturing of Microencapsulated Device. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*., 4, 182-185.

Hern_andez-Carranza P., L_opez-Malo A., Jim_enez-Mungu M.T.(2013). Microencapsulation quality and efficiency of *lactobacillus casei* by spray drying using maltodextrin and vegetable extracts. *Journal of Food Research*, 3, 61-69.

Juven B.J., Pierson M.D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide

Mahmoudzadeh M., (2016). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *IJFS*, 15 (1), 347-359.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Bradley G., Baker R.T.M., Davies S.J. (2010b). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16, 504–510.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bøgwald J., Castex M., Ringø, E. (2010a). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302,1–18.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J. (2010b). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16, 504–510.

Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. (1990). Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol*. 28, 2059–63.

Nafisi Bahabad M., Azhar L. (2015). Overview of cold water fish aquaculture rapid growth in Iran. *Aquaculture Europe 15*,Available:https://www.was.org/easonline/Mobile/Paper.aspx?i=1867.

Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Salminen S., Bylund G (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198: 229–236.

Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol*., 15, 443-52.

Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius, E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol*., 15, 443-52.

Oelschlaeger T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int J Med Microbiol*, 300: 57–62.

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. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 28, 379–388.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi T, Sugita H., Puangkaew, J., and Aoki, T., (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developm Comparat Immunol*., 31, 372 – 382.

Ramos M.A., Gonçalves J.F., Batista S., Costas B., Pires M.A., Rema P., Ozório R.O. (2015). Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish Shellfish Immunology*, 45, 19-26.

Rodas C, Gelvez N, Keyeux G.(2002). Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and Mestizo Populations. Hum Biol.,75, 13–30

Todar K. (2008). Online textbook of bacteriology. Lactic Acid Bacteria, P.5. http://textbookofbacteriology.net/lactics.html.

Tomas M.S., Claudia Oter M., Ocana V., Elena Nader-Macias M. (2004). Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. *Methods Mol. Biol.* , 268:337–346.

Tomás M.S., Otero M.C., Ocaña V.S., Nader-Macías M.E. (2004). Production of antimicrobial substances in lactic acid bacteria. Determination of hydrogen peroxide. In: Spencer JFT, de Ragout Spencer AL (eds) Methods in molecular biology. Public health microbiology: methods and protocols, vol 268. Humana Press Inc., Totowa, pp 337–346

Van Gerven N., Waksman G., Remaut, H. (2011). Pili and flagella: biology, structure, and biotechnological applications. *Prog Mol Biol transl Sci*, 103, 21-27.

Van Wamel W.J., Hendrickx A.P., Bonten M.J., Top J., Posthuma G., Willems R.J. (2007). Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun*. ,75, 924-31.

Verschuere, L., Rombaut G, Sorgeloos P. and Verstraete W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64, 655-71.

Zuidam N.J., Nedović V. (2010). Encapsulation technologyies for active food ingredients and food processing. Springer, New York, P. 269.

Rokka S., Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol.*, 231, 1–12.

Rosas-Ledesma P., LeÓn-Rubio J.M., AlarcÓn F.J., Balenona M.C. (2011). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: Assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43, 106 – 116.

Rumpold B.A., Schlüter O. K. (2013) Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 1-11.

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

Samantaray K., Mohanty S.S., (1997). Interactions of dietary levels of protein and energy on fingerling snakehead, Channa striata. Aquaculture, 156, 241–249.

Sheu T.Y., Marshall R.T., Heymann H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J. Dairy Sci*,. 76, 1902-7.

Sun Y.Z., Yang H.L., Ma R.L., Song K., Li, J,S. (2011). Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 18, 281–289.

Effects of dietary supplementation with encapsulation form of *Enterococcus faecium* on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Armin Abedian Amiri[1]; Ghobad Azari Takami[1]*; Mohammad Afsharnasab[1]; Vadood Razavilar[2]

1- Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Food Quality Control, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author : takami85@hotmail.com

Received:2016/7/2 Accepted:2017/1/8

Abstract

This study examined the effects during 56 days of feeding of three dietary probiotics on growth performance and feed utilization, intestinal colonization and related health criteria in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). This study included 3 groups: a control group of fish, and fish fed with a basal commercial diet supplemented with 2.5×10^8 CFU g^{-1} *Enterococcus faecium* strain IR5 (group 1) (was micro-encapsulated with sodium alginate) and 1×10^9 CFU g^{-1} *Enterococcus faecium* strain IR5 (group 2) (was micro-encapsulated with sodium alginate) singularly in triplicate. 270 rainbow trout with an average weight of 35.6 ± 3.8 g (mean±SD) were obtained. Fish were acclimatized for 20 days. The probiotics groups showed improvement with respect to weight gain (WG), body weight index fish (BWI) (%), total length (TL), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER), lactic acid bacteria (LAB) (%) in intestinal, intestinal colonization (log CFU g^{-1}) and survival (%). At 28 days, group 2 showed improvement with respect to growth performance and feed utilization, intestinal colonization and related health criteria were higher than other groups. At 56 days, the WG and PER in the group 1 were significantly higher than in 2 and control groups ($P<0.05$). The LAB (%) in intestinal was higher in group 2 than in 1 and it was higher in group 1 than in the control groups after 8 weeks feeding ($P<0.05$).

Keywords: Rainbow trout, *Enterococcus faecium*, micro-encapsulation, Growth and health performance, feed utilization