مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۹۰-۱۸۱
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.209113.2485

بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (*Lactobacillus bulgaricus*) ریزپوشانی شده با نانوذرات آلژینات/کیتوزان بر رشد و کارایی تغذیه در فیل ماهی جوان (*Huso huso*)

سید صمد حسینی[1*] مجتبی علیشاهی[2] کوروش امینی[3] محمدرضا عباسپور[4] مسعود قربانپور[5] تکاور محمدیان[2]

۱) گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
۳) مرکز تحقیقات آبزی پروری ایران، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان داخلی گرگان، گلستان، ایران
۴) مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده علوم پزشکی، مشهد، ایران
۵) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۰ مهر ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۷ دی ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: در آبزی پروری رشد سریع، کارایی مناسب تغذیه و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها بسیار مطلوب است. یکی از راهکارهای مناسب برای بهبود شاخص‌های رشد و مقاومت ماهی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی است. **هدف:** مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با نانوذرات آلژینات/کیتوزان بر رشد و کارایی تغذیه در فیل ماهی جوان (*Huso huso*) انجام گرفت. **روش کار:** این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب چهار گروه تیمار و یک گروه شاهد هر کدام با سه تکرار صورت پذیرفت، برای این منظور تعداد ۳۷۵ قطعه فیل ماهی با میانگین وزنی ۲/۲±۲۷/gr۸ در پنج گروه تقسیم شدند.تیمارهای آزمایشی شامل: T۱ با غذای حاوی آلژینات/کیتوزان بدون باکتری، T۲ با غذای حاوی باکتری ریزپوشانی شده به روش امولسیون، T۳ با غذای حاوی باکتری ریزپوشانی شده به روش ژلاسیون یونی، T۴ با غذای حاوی باکتری بدون پوشش و گروه شاهد با غذای پایه تغذیه شدند. ماهیان روزانه به میزان ۳ ٪ وزن بدن تغذیه شدند. **نتایج:** نتایج نشان دادند که حداکثرمقدار ضریب تبدیل غذایی (FCR) در T۳ (۰/۱۱±۱/۶۴) و کمترین آن در T۴ (۰/۰۶±۱/۱۴) بود. T۴ در شاخص‌های FER، PER، SGR، در روز ۳۰ و ۶۰ دارای بهترین عملکرد نسبت به سایر تیمارها بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد رشد در تیمارهایی که کیتوزان و آلژینات به عنوان پوشش حضور داشتند نسبت به تیمار لاکتوباسیلوس بدون پوشش پایین تر بود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، ریزپوشانی، فیل ماهی، شاخص‌های رشد

مقدمه

آبزی پروری در طی دهه‌های گذشته در جهان و به خصوص در ایران از رشد قابل توجهی برخوردار بوده است. در سال ۲۰۱۲ تجارت آبزیان ۱۰٪ تجارت کشاورزی و ۱٪ تجارت کل جهانی را تشکیل داده است. میزان درصد آبزیان به کل مواد غذایی تجارت شده از ۲۵٪ در سال ۱۹۷۶ به بیش از ۴۰٪ در سال ۲۰۱۲ افزایش داشته است (۱۳). پرورش ماهیان خاویاری جهت تولید گوشت و خاویار در جهان سابقه ۴۵ ساله دارد و از روسیه آغاز شد. در ایران ۲۶ سال پیش در مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید بهشتی با استفاده از بچه ماهیان حاصل از تکثیر مصنوعی، فیل ماهی (*Huso huso*)، قره برون (*Acipenser persicus*) و چالباش (*Acipenser goldenststii*) پرورش مصنوعی این گونه‌ها آغازشد (۴۶). از اهداف مهم آبزی پروری رشد سریع، کارایی تغذیه و افزایش مقاومت در برابر بیماری است. علی رغم شاخص‌های رشد مناسب این ماهی در شرایط طبیعی، در شرایط پرورش مصنوعی یکی از اهداف اصلی بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی با توجه به ویژگی‌های تغذیه‌ای خاص این ماهی هاست. یکی از راهکارهای مناسب برای بهبود شاخص‌های رشد و مقاومت ماهی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی است. مطالعات متعدد صورت گرفته نشان می‌دهد به کارگیری باکتری‌های پروبیوتیکی در مراحل اولیه زندگی آبزیان، باعث ارتقاء رشد و کارایی تغذیه در آن‌ها شده و همچنین به عنوان جایگزینی برای روش‌های درمانی مطرح گردیده است (۱۵،۴۴). تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی، با رویکردهای متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکو شیمیایی محیط پرورشی، پیشگیری از ابتلاء و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و همچنین ارتقاء عملکرد رشد آبزیان پرورشی در تحقیقات بی‌شماری توسط محققان شیلاتی تأیید شده است. Lara-Flores و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که مکمل سازی جیره‌های مورد استفاده در پرورش تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus*، *Streptococcus faecium* و نیز *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان مکمل غذایی باعث افزایش درصد بقا تا حدود ۲۷ ٪ می‌شود و تأثیر بسیار خوبی را بر افزایش وزن بدن، نرخ رشدویژه و دیگر شاخص‌های رشد در این ماهی داشت. لاروهای

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۵۵۱۱۰ نمابر: ۰۱۷-۳۲۲۴۰۲۹۰ Email: samad_hosseini@ymail.com

تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) تغذیه شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی ریزپوشانی شده زیستی با ناپلی آرتمیا اورمیانا (*Artemia urmiana*)، نشان داد که این پروبیوتیک‌ها تأثیر بسیار خوبی را در افزایش معیارهای رشد ایفا نمودند(۲۱). هم چنین عملکرد رشد، معیار-های تغذیه‌ای و ارتقا سطوح مواد مغذی بدن لاروهای فیل ماهی بدنبال به کارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیکی با استفاده از غنی سازی ناپلی آرتمیا اورمیانا نیز افزایش یافت (۲۲). Mohammadian و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای روی ماهی شیربت با استفاده از خوراک حاوی سه پروبیوتیک] لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*)، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (*L. bulgaricus*)، لاکتوباسیلوس کازیی (*L. casei*)[نشان داد که تیمار لاکتوباسیلوس بولگاریکوس دارای اثرات مفیدی بر ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر عفونت باکتریایی در ماهی شیربت می‌باشد.

یکی از مشکلات اصلی پروبیوتیک‌های معمول، کاهش زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در شرایط دستگاه گوارش است. تحقیقات نشان داده که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک ریزپوشانی شده نسبت به باکتری‌های آزاد به مراتب بیشتر است (۲۳،۳۶). میزان مناسب پیشنهاد شده برای پروبیوتیک‌ها در غذا برای رسیدن به این هدف متغیراست. به طور کلی تعداد ۱۰۶ عدد باکتری زنده در هر گرم غذا در زمان مصرف مورد نیاز است (۸). فرآیند ریزپوشانی، سلول‌ها را در یک بافت یا غشای کپسول دار محصور کرده و در برابر شرایط نا مساعد اسیدی معده و آنزیم‌های روده محافظت می‌کند (۱۱). استفاده از این روش جذب مواد مغذی را کند و سرعت آزادسازی متابولیت‌ها را از طریق ساختار کپسول آلژینات کند می‌کند (۲) و به بقا باکتری مورد نیاز در محصولات غذایی همراه با زیست پذیری و زنده مانی خوب، کمک می‌کند (۹،۳۶). مواد مختلفی جهت ریزپوشانی باکتری‌ها استفاده می‌شود و هر کدام نقش متفاوتی ایفا می‌کنند. ازجمله می‌توان آلژینات کلسیم و سدیم ، نشاسته مقاوم ذرت ،کیتوزان، کاراجینان و ..... را نام برد. این پوشش‌ها تحت شرایط ویژه‌ای مثل دما، pH ، فشار و ..... محتویات خود را رها می‌کنند (۳۳،۳۹). در این میان آلژینات پرکاربردترین ماده است و از جلبک دریایی استخراج می‌شود. علت استفاده از آن ارزانی، سهولت کاربرد، سمی نبودن، فناوری آسان و مطابقت و سازگاری با محیط زیست می‌باشد و به عنوان افزودنی مجاز غذایی شناخته شده است از طرفی خود این ماده دارای اثرات تحریک ایمنی است(۱،۲۵). کیتوزان یک ماده پلی مری خطی بوده و دارای گروه‌های آمین و هیدروکسیل فعال می‌باشد و به عنوان فراوانترین پلی‌مر بیولوژیک بعد از سلولز در جهان مطرح بوده و در اسکلت خارجی سخت پوستان، حشرات، دیواره برخی میکروب‌ها مثل قارچ آسپرژیلوس حضور دارد (۱۰،۱۲). کیتوزان دارای خواص بیولوژیکی مانند افزایش، تحریک و تعدیل ایمنی (۱۷،۲۸،۲۹)، اثرات ادجوانتی (۷،۴۰) و ضد توموری (۳۸)، افزایش رشد (۲۴)، فعالیت ضد میکروبی (۳۴) و آنتی‌اکسیدانی (۴۷) می‌باشد. گزارشات متعدد و بعضاً متناقضی از اثرات کیتوزان بر شاخص‌های رشد (۱۴،۲۷،۲۸) و فاکتورهای خونی آبزیان مختلف وجود دارد (۲۷). باکتری‌های پروبیوتیک متفاوتی در محصولات متنوع غذایی ریزپوشانی شده اند و اکثر آن‌ها از جنس لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدو باکتریوم‌ها هستند.

فیل ماهی یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری است که در سال‌های اخیر به دلایل مختلف از جمله صید بی رویه و غیر مجاز، آلودگی‌های زیست محیطی، ازبین رفتن مناطق مناسب تخم ریزی، سد سازی بر روی رودخانه‌ها و محدود شدن آب‌های جاری، از طرف سازمان جهانی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی(IUCN) به عنوان گونه‌ی در معرض خطر انقراض معرفی شده است (۲۰). در چنین شرایطی برای حمایت از ماهیان خاویاری حوضه دریای خزر، توجه به پرورش تجاری آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به مشکل بقای نسبتا پایین و شاخص رشد نامطلوب این گونه در مراکز تکثیر و پرورش در این تحقیق، امکان بهبود شاخص‌های رشد و بقای این گونه بدنبال استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با نانوذرات آلژینات و کیتوزان بررسی گردید.

مواد و روش کار

تهیه پروبیوتیک: دراین تحقیق از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Tor grypus*) استفاده شد. این باکتری با استفاده از ژن 16s rRNA در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۲ جداسازی و شناسایی شد(۳۲). باکتری مورد نظر در ml ۲۰ محیط کشت مایع MRS در دمای $37\ ^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی فعال گردید، سپس نمونه حاصل در محیط کشت MRS Agar به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37\ ^{\circ}C$ و در شرایط بی هوازی و در انکوباتور کشت داده شد. پس از رشد، نمونه_ها با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند و با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون در آمد و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند با غلظت $۲/۴ \times ۱۰^{۹}$ باکتری زنده در هر میلی لیتر تنظیم شدند و جهت ریزپوشانی کردن به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور منتقل شدند

فرآیند ریزپوشانی: در این تحقیق از دو روش ریزپوشانی باکتری بهره گیری شد.

روش امولسیون: براساس روش Huiyi و همکاران در سال ۲۰۱۳ابتدا g ۵ پودر کربنات کلسیم به ml ۱۰۰ آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد. مقدار ml ۳/۵ سوسپانسیون کربنات کلسیم به ml ۵۵ محلول آلژینات ۲٪ بر روی دستگاه هم زن مغناطیسی با دور rpm ۲۰۰در حال گردش اضافه و مدت ۳۰ دقیقه هموژن می‌گردد. ml ۱۰ از محلول حاصل با ml ۵ سوسپانسیون میکروبی با غلظت ($۲/۴ \times ۱۰^{۹}$) مخلوط و به مدت

۱۵ دقیقه با هم زن با دور rpm ۳۵۰ هموژن شـد. در بشردیگر، مقدار ml ۳۵ روغـن گیاهی(روغن کلزا) را با g ۰/۵ ،اسـپن ۸۰ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه آن را با دور rpm ۱۰۰ هم زده. سـپس محلول حاصل را با محلول بالا مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن آزمایشـگاهی هموژن کرده. ml ۱۰روغن کلزا و ml ۰/۵ اسید استیک را با هم مخلوط و آن را قطره قطره به محلول فوق اضافه نموده تا pH به حدود ۳/۵ برسد و ۳۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰ هم زده می‌شـود. سپس با اسـتفاده از بافر فسفات محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا روغن از محصول جدا شود. در مرحله نهایی به میزان ml ۱۵ محلول کیتوزان ۰/۴ ٪ به مدت ۳۰ دقیقه ، قطـره قطره با دور rpm ۸۰۰ به محلول اضافه شـد و بعد به مدت یک ساعت در حالت چرخش گذاشته تا به هم زده شود. در نهایت باکتری‌های ریزپوشانی شده را به وسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری می کنیم(۱۸).

روش ژلاتاسیون یونی: این روش یک فرآیند دو مرحله‌ای چند یونی با کلرید کلسیم و به دنبال ارتباط متقاطع چند کاتیونی تهیه می‌شود. به طور خلاصه، ml ۱۱۷/۵ محلول آلژینات-سـدیم ۰/۰۶۳ ٪ را که pH آن روی ۴/۹ تنظیم شـد را با سوسپانسیون باکتریایی مخلوط و در حالت چرخش با دور rpm ۸۰۰ در دقیقه هموژن کرده. سـپس ml ۷/۵ از محلول کلرید کلسیم m/m ۱۸ را قطره قطره در مدت ۶۰ دقیقه به آن اضافه تا یک پیش ژل آلژینات تهیه گردد. سـپس ml ۲۵ از محلول کیتوزان ۰/۰۷ ٪ را که pH آن روی ۴/۶ تنظیـم شـد را قطره قطـره به پیش ژل طی ۹۰ دقیقه اضافـه می‌کنیم. بعد از اضافه کردن کیتـوزان، اجازه می‌دهیم تا به مدت ۳۰ دقیقه دیگر نیز در شـرایط فوق باقی بماند تا کپسولاسیون کامل شود. کپسول‌ها را با سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی می‌نماییم(۳۰).

طراحی آزمایش: این تحقیق در سـال ۱۳۹۴ در اسـتان گلستان و در ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره سو واقع در ناحیه جنوب شرقی خلیج گرگان در فاصله Km ۵ شهرستان بندر ترکمن انجام شد. تعداد ۳۷۵ قطعه بچه فیل ماهی با میانگین وزن gr۸ ۲۷/۲±۲/g از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شـهید مرجانی تهیه و پس از دو هفته سـازش با غذای دسـتی (شـرکت فرادانه) مورد استفاده، در ۱۵ تانک فایبر گلاس (۵ تیمار هرکدام بـا ۳ تکرار) بـا حجم آبگیری L ۱۰۰۰ و با تراکـم ۲۵ قطعه در هر تانک ذخیره سازی شـدند. جهت تأمین نیاز اکسیژنی علاوه بر جریان دار بودن آب از سیستم هوادهی استفاده‌شد. تغذیه ماهیان در تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی به میزان ۳٪ وزن توده زنده آن‌ها محاسبه و روزانه در سه نوبت در ساعات ۸ صبح ، ۱۴ و ۲۰ به آن‌ها داده شد. جهت تعیین توده زنده هر یک از تیمارها، هر ۱۵ روز یکبار ۱۰۰٪ ماهیان هر تکرار با ترازوی دیجیتال با دقت g ۰/۱ توزین و طول کل آن‌ها با تخته بیومتری با دقت mm ۱ اندازه گیری شـد. قبل از انجام زیسـت سنجی، بچه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند. غذای استفاده شده در این تحقیق غذای کنسانتره شرکت فرادانه مخصوص ماهیان خاویاری از روز صفر تا ۳۰ با سایز پیش پروای FFS۲) (و از روز ۳۰ تا روز ۶۰ با سایز پروای (GFS۱) بود.

به منظور بررسـی تأثیر پروبیوتیک لاکتو باسیلوس بولگاریکوس بر رشـد و پارامترهای خونی و سرمی ماهیان، ۵ تیمار غذایی تهیه شد. تیمار یـک با غذای حـاوی آلژینات/کیتوزان بدون باکتری، تیمـار دو با غذای حاوی باکتری ریزپوشانی شده با روش امولسیون، تیمار سه با غذای حاوی باکتری ریزپوشـانی شـده با روش ژلاتاسـیون یونی، تیمار چهار با غذای حاوی باکتری بدون پوشـش و تیمار پنج با غذای پایه تغذیه شدند. بدین منظور، غذای مورد نیاز برای هر هفته محاسبه و به میزان ۲×۱۰^{۹} باکتری ریزپوشانی به هر گرم غذا اضافه شد و سپس در شرایط سایه و در مجاورت جریان هوای خشـک و در طول مدت مصرف در یخچال نگهداری شد. در پایان شـاخص‌های رشد گروه‌های آزمایشی در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ بر اساس رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شدند.

میزان رشد روزانه = میانگین وزن اولیه (g)- میانگین وزن ثانویه(g) / میانگین وزن اولیه(g)

ضریب رشـد ویژه (درصد در روز)= دوره پرورش/ ((وزن اولیه) Ln – (وزن نهایی) Ln) ×۱۰۰

ضریب چاقی ($g/cm^{۳}$)= ۳ طول (cm)/۱۰۰× وزن نهایی (g)

ضریب تبدیل غذا= افزایش وزن (g) / غذای داده‌شده (g)

میانگین رشد روزانه (g)= ۳ طول (cm)/۱۰۰× وزن نهایی (g)

میزان کارآیی پروتئین وزن اولیه (g) – وزن نهایی (g) / پروتئین مصرفی

کارایی غذا= غذای خشک داده شده (g) / افزایش وزن (g)

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدسـت آمده از زیسـت سنجی ماهیان و شاخص‌های رشد محاسبه شده، در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ انجام گرفت. برای مقایسـه میانگین‌ها از روش آنوای یک طرفه (One Way ANOVA) و پس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

ب-۱- افزایش رشـد نسـبی: نتایج مربوط به شـاخص‌های رشد در جدول ۲ آورده شـده اسـت. هر چند افزایش نسـبی این شاخص در برخی مراحل نمونه گیری در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شـد، ولی این افزایـش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$) بیشـترین افزایش وزن در روز ۳۰ در تیمار چهار وکمترین در تیمار دو مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت($p>۰/۰۵$). در روز ۶۰ نیز کمترین میزان افزایش وزن بدن در تیمار دو مشاهده شد که با گروه کنترل اختـلاف معنی‌داری داشـت ($p<۰/۰۵$). هم چنیـن در روز ۳۰ آزمایش در تمامی گروه‌ها افزایش وزن معنی‌داری نسبت به تیمارهای روز ۶۰ مشاهده

جدول ۱. ترکیب جیره مورد استفاده شرکت فرادانه مخصوص ماهیان خاویاری.

نوع جیره	پروتیین خام (حداقل)	چربی خام (حداقل)	فیبر خام (حداکثر)	خاکستر (حداکثر)	رطوبت (حداکثر)	فسفر (حداقل)	اندازه خوراک mm
FFS۲	٪۴۵	٪۱۶	٪۳/۵	٪۱۰	٪۱۰	۱/۱	۳-۲/۵
GFS۱	٪۴۰	٪۲۰	٪۴/۵	٪۱۰	٪۱۰	۱	۶-۵

شد ($p<0/05$).

ب-۲- ضریب رشد ویژه (Specific Growth Ratio): تجویز پروبیوتیک به دو روش توضیح داده شده در این تحقیق باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در ضریب رشد ویژه بین تیمارها هم در روز ۳۰ و هم در روز ۶۰ تحقیق گردید($p<0/05$) بطوریکه در روز ۳۰، تیمار دو کمترین و تیمار چهار بالاترین ضریب رشد ویژه را داشتند که با یگدیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p<0/05$). در روز ۶۰ نیز بیشترین میزان ضریب رشد ویژه مربوط به تیمار چهار و گروه کنترل بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار دو نشان دادند($p<0/05$). از طرفی مقایسه نتایج ضریب رشد ویژه در هر تیمار در دو مرحله نمونه گیری نشان داد که تمامی تیمارهای روز ۳۰ اختلاف معنی‌داری با روز ۶۰ داشتند($p<0/05$).

ب-۳- ضریب تبدیل غذایی (Food convertion ratio): نتایج مربوط به ضریب تبدیل غذایی طی ۲ ماه در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین ضریب تبدیل غذایی روز ۳۰ و ۶۰ در تیمار چهار (لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بدون پوشش) به ترتیب برابر با ۰/۰۶±۱/۱۴ و ۰/۰۹±۱/۳۲می‌باشد که در بین تیمارهای آزمایشی دارای کمترین میزان می‌باشد و به عنوان بهترین تیمار شناخته شد. اما در ۳۰ روز اول بیشترین مقدار مربوط به تیمار سه (۰/۱۱±۱/۶۴) می‌باشد که با تیمار کنترل و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد($p<0/05$).

ب-۴- فاکتور وضعیت (Condition Factor): نتایج مربوط به فاکتور وضعیت نشان داد که در تمامی تیمارهای آزمایشی کاهش میزان ضریب چاقی نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری در روز ۳۰ مشاهده گردید($p<0/05$). در روز ۶۰ آزمایش نیز اکثر تیمارها کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد($p<0/05$) ولی با دیگر گروهها اختلاف معنی‌داری نداشته است ($p>0/05$).

مقایسه این فاکتور در روز ۳۰ و ۶۰ با یکدیگر نشان داد که در تمامی تیمارها به جز تیمار دو روز ۶۰ هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین این دو روز مشاهده نگردید ($p>0/05$).

ب-۵- بازدهی پروتئین Protein Efficiency Ratio (PER): نتایج مربوط به محاسبات نسبت بازدهی پروتئین طی ۲ ماه، نشان می‌دهد که در روز ۳۰ میانگین نسبت بازدهی پروتئین در تیمار سه برابر با ۰/۰۹± ۱/۳۵ کمترین مقدار و دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل و دیگر تیمارها می‌باشد($p<0/05$)، ولی بین سایر تیمارها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). مقایسه این فاکتور بین تیمارها در روز ۶۰ نشان داد که بین تیمار دو و چهار اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$)، ولی با گروه کنترل و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). مقایسه این فاکتور بین روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش نشان از اختلاف معنی‌دار تیمارها بین این روزها دارد ($p<0/05$).

ب-۶- میزان کارایی غذا Food Efficiency Ratio (FER): نتایج مربوط به محاسبات نسبت کارایی غذا در طی۲ ماه، نشان می‌دهد که در روز ۳۰ کمترین مقدار مربوط به تیمار سه به میزان (۴/۳۴±۶۱/۰۳) می‌باشد که با گروه کنترل و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارد($p<0/05$)و بیشترین مقدار مربوط به تیمار چهار می‌باشد که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ندارد ($p>0/05$). در روز ۶۰ آزمایش کمترین مقدار مربوط به تیمار دو (۴/۷۱±۶۵/۴۶) و بیشترین مقدار آن مربوط به تیمار چهار (۵/۷۳±۷۵/۹۸) می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($p<0/05$) ولی با گروه کنترل و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0/05$).

ب-۷- درصد افزایش وزن روزانه Daily weight growth (DWG): نتایج مربوط به محاسبات این فاکتور در طی ۲ ماه نشان می‌دهد که در روز ۳۰ کمترین مقدار آن مربوط به تیمار یک (۰/۱۵±۲/۸۸) و بیشترین مقدار آن مربوط به تیمار دو (۰/۱۰±۳/۴۲) می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($p<0/05$) ولی با گروه کنترل و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0/05$). در روز ۶۰ کمترین مقدار مربوط به تیمارهای یک (۰/۱۹±۳/۵۶) و دو (۰/۱۹±۳/۵۵) و بیشترین مقدار مربوط به تیمار چهار (۰/۱۹±۴/۱۳) می‌باشد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($p<0/05$) ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دیده نشده است ($p<0/05$).

بحث

در مطالعه حاضر اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با دو روش امولسیون وژلاسیون یونی در جیره غذایی بچه فیل ماهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق در دو بخش قابل بررسی است، اولا مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمار شاهد و تیمار پروبیوتیک (بدون ریز پوشانی) نشان داد که شاخص‌های رشد به خوبی تحت تأثیر تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس قرار گرفته و بهبود شاخص‌های رشد قابل ملاحظه است. از سوی دیگر مقایسه‌ی تجویز پروبیوتیک به تنهایی با پروبیوتیک ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان و آلژینات بر شاخص‌های رشد فیل ماهی جوان بود که نتایج این تحقیق نشان داد که ریزپوشانی پروبیوتیک با نانوذرات کیتوزان و آلژینات تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد فیل ماهی جوان نداشته است. از طرف دیگر تجویز

جدول ۲. مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی در مدت ۲ ماه تغذیه با جیره آزمایشی (نتایج براساس Means±SD گزارش شده اند). حروف کوچک لاتین غیر همنام روی انحراف معیار نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون. و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد.

شاخص	تیمار	روز ۳۰	روز ۶۰
درصد افزایش وزن	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۳۲۳/۲۸±۲۴/۰۵ ab,A	۹۴/۵۲±۸/۸۰ ab,B
	T2 (امولسیون اینترنال)م	۳۱۸/۸۳±۲۴/۶۴ b,A	۷۸/۹۶±۴/۳۸ b,B
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۳۶۹/۵۲±۲۷/۵۶ ab,A	۹۹/۹۸±۱۵/۶۹ a,B
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۳۷۸/۵۳±۳۲/۶۴ a,A	۱۰۱/۰۷±۹/۵۵ a,B
	T5 (گروه شاهد)	۳۵۰/۱۳±۳۲/۲۷ ab,A	۱۰۲/۳۷±۹/۳۹ a,B
CF شاخص کیفیت	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۰/۳۴۳±۰/۰۰۹ b,A	۰/۳۴۷±۰/۰۰۵ ab,A
	T2 (امولسیون اینترنال)	۰/۳۳۸±۰/۰۰۱ b,A	۰/۳۱۵±۰/۰۰۸ b,B
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۰/۳۳۴±۰/۰۱۰ b,A	۰/۳۵۲±۰/۰۰۸ b,A
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۰/۳۳۵±۰/۰۰۴ b,A	۰/۳۵۴±۰/۰۴۳ ab,A
	T5 (گروه شاهد)	۰/۳۶۸±۰/۰۰۳ a,A	۰/۳۶۷±۰/۰۰۸ a,A
FCR ضریب تبدیل غذایی	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۱/۲۷±۰/۰۶ b,B	۱/۴۳±۰/۰۷ ab,A
	T2 (امولسیون اینترنال)	۱/۲۷±۰/۰۳ b,B	۱/۵۳±۰/۱۱ a,A
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۱/۶۴±۰/۱۱ a,B	۱/۳۶±۰/۱۴ ab,A
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۱/۱۴±۰/۰۶ b,B	۱/۳۲±۰/۰۹ b,A
	T5 (گروه شاهد)	۱/۲۶±۰/۱۱ b,B	۱/۴۰±۰/۰۶ ab,A
SGR میزان رشد ویژه	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۰۸±۰/۰۸ ab,A	۰/۹۶±۰/۰۶ ab,B
	T2 (امولسیون اینترنال)	۲/۰۷±۰/۰۸ b,A	۰/۸۴±۰/۰۳ b,B
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۲/۲۳±۰/۰۸ ab,A	۱/۰۰±۰/۱۱ a,B
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۲/۲۶±۰/۰۹ a,A	۱/۰۱±۰/۰۶ a,B
	T5 (گروه شاهد)	۲/۱۷±۰/۱۰ ab,A	۱/۰۱±۰/۰۶ a,B
PER میزان کارایی پروتیین	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۱/۷۴±۰/۰۹ b,A	۰/۵۸±۰/۰۳ ab,B
	T2 (امولسیون اینترنال)	۱/۷۴±۰/۰۵ b,A	۰/۵۴±۰/۰۳ a,B
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۱/۳۵±۰/۰۹ a,A	۰/۶۱±۰/۰۶ ab,B
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۱/۹۴±۰/۱۰ b,A	۰/۶۳±۰/۰۴ b,B
	T5 (گروه شاهد)	۱/۷۶±۰/۱۴ b,A	۰/۵۹±۰/۰۲ ab,B
DWG میزان رشد روزانه	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۸۸±۰/۱۵ b,B	۳/۵۶±۰/۱۹ b,A
	T2 (امولسیون اینترنال)	۳/۴۲±۰/۱۰ a,A	۳/۵۵±۰/۱۹ b,A
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۳/۰۸±۰/۲۱ ab,B	۳/۸۹±۰/۴۰ ab,A
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۳/۲۴±۰/۱۸ ab,B	۴/۱۳±۰/۲۱ a,A
	T5 (گروه شاهد)	۳/۰۹±۰/۲۶ ab,B	۴/۰۶±۰/۰۹ a,A
FER میزان کارایی غذا	T1 (آلژینات/کیتوزان)	۷۸/۶۵±۴/۱۴ a,A	۶۹/۹۹±۳/۸۵ ab,B
	T2 (امولسیون اینترنال)	۷۸/۳۳±۲/۳۱ a,A	۶۵/۴۶±۴/۷۱ b,B
	T3 (ژلاتاسیون یونی)	۶۱/۰۳±۴/۳۴ b,A	۷۴/۰۱±۷/۶۴ ab,B
	T4 (بولگاریکوس بدونه پوشش)	۸۷/۳۹±۴/۸۸ a,A	۷۵/۹۸±۵/۷۳ a,B
	T5 (گروه شاهد)	۷۹/۳۶±۶/۷۱ a,A	۷۱/۱۹±۳/۲۱ ab,B

نانوذرات کیتوزان و آلژینات به تنهایی (فاقد پروبیوتیک) نیز تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد فیل ماهی جوان نداشت.

پروبیوتیک‌ها همواره به دلیل داشتن مزایای فراوان به عنوان یکی از راه‌های افزایش بازده آبزی‌پروری مطرح بوده‌اند. Pirarat و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تحقیق خود عنوان نمودند که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک، دارای ریزپرزهای طویل‌تری نسبت به گروه کنترل هستند و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و نهایتاً باعث افزایش سطح جذب می‌شوند. همچنین پروبیوتیک‌ها باعث تحریک تکثیر سلول‌های اپیتلیالی دستگاه گوارش می‌شوند (۱۹). پروبیوتیک‌ها پس از رسیدن به روده شروع به تکثیر کرده و از قندها جهت رشد خود و تولید مواد سازنده‌ی اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه استفاده می‌کنند. این اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریزپرزهای

روده دارند (۳۵). اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه بخصوص بوتریک اسید بعنوان اصلی‌ترین منبع انرژی برای سلول‌های اپیتلیال روده محسوب می‌شود. همچنین بوتریک اسید می‌تواند باعث آزادسازی پپتیدهای روده‌ای و فاکتورهای رشدی شوند که در تکثیر سلول‌های اپیتلیالی موثرند (۶).

تعـدادی از محققیـن مطالعاتـی را در مورد تأثیر جداگانـه و ترکیبی پروبیوتیک‌ها بر گونه‌های مختلف آبزی انجام داده‌اند. در مطالعه‌ای که بر روی کپور معمولی صورت گرفته است، دیده شد که استفاده از پروبیوتیک باسیلی باعث افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی شده است (۴۵). به علاوه Bagheri و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که پروبیوتیک‌های تجـاری *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis* قادر به بهبود درصد بقاء، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی و افزایش تعداد باسیلوس‌های دستگاه گوارش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشند.

در افزایش وزن و درصد افزایش وزن نسبی بدن تحقیق حاضر در روز ۳۰ دیده می‌شـود که تیمار چهار (بیشترین) با تیمار دو (کمترین) اختلاف معنی‌داری را نشان داده‌اند، ولی با سپری شدن زمان آزمایش، دیده شد که تیمارهای سه، چهار و گروه کنترل تفاوت معنی‌دار را با تیمار یک و دو نشان می‌دهند که این مسـأله احتمالاً مربوط به اثـر نا مطلوب کیتوزان بر روی شـاخص‌های رشد می‌باشـد چرا که در تیمار یک و دو از کیتوزان بیشتری جهت ریزپوشـانی باکتری اسـتفاده گردید. در مطالعه Tafi و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Shiau و Yu در سال در سال۱۹۹۹ اثرمنفی تجویز خوراکی کیتوزان به ترتیب بر روی قزل‌آلای رنگین کمان و تیلاپیا گزارش شد که همسـو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. گزارشاتی هم حاکی از تأثیر مثبت کیتوزان بر شاخص‌های رشد ماهیان مختلف می‌باشد،Gopalakanna و Arul در سـال ۲۰۰۶ اثـر مثبت تجویزخوراکی کیتوزان ۱٪ را بر رشـد ماهی کپورمعمولی گزارش کردند. Geng و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز، کیتوزان به میزان ۳g/Kg Food و۶ را باعث افزایش برخی شاخص‌های رشـد ماهی *Rachycentron canadum* دانستند که خلاف نتایج این تحقیق را نشان می‌دهد.

افزایش شـاخص‌های رشـد بدنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها در تحقیقات مختلف گزارش شـده اسـت(۴). تیمار چهار (غذای حاوی لاکتو باسـیلوس بدون پوشش) در شـاخص‌های FCR (ضریب تبدیل غذایی)، SGR (میزان رشد ویژه)،PER (میزان کارایی پروتئین)،FER (میزان کارایی غـذا) در مـدت ۶۰ روز دوره آزمایش عملکرد بهتری از خود نشـان داد به طوری که دلیل آن را می‌توان به استقرار بیشتر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در تیمار چهار نسبت به سایر گروه‌ها اشاره کرد.

لازم به ذکر است تمامی شاخص‌های رشد درطی ۳۰ روز دوم آزمایش نسبت به ۳۰ روز اول دوره آزمایش، کاهش نشان داده است که این وضعیت را می‌توان به دو دلیل نسـبت داد اولا تغییر جیره مصرفی از پیش پرواری (FFS۲) در ۳۰ روز اول بـه غذای پـرواری (GFS۱) در ۳۰ روز دوم به دلیل تغییر در اندازه ماهی و اسـتفاده از جیره غذایی با سـایز بزرگتر و متناسـب با دهان ماهیان اشـاره کرد که از میزان پروتئین کمتـری برخوردار بود، و دلیل دوم کاهش سـرعت رشد و شـاخص‌های تغذیه‌ای با افزایش سن و سایز ماهی در طول دوره زندگی است که معمولا تا زمان بلوغ جنسی ادامه می‌یابد.

در تحقیق حاضر پس از دو ماه بررسی مشخص گردیدکه عملکرد رشد در تیمارهایی که کیتوزان و آلژینات به عنوان پوشش حضور داشت نسبت به تیمار لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بدون پوشش پایین‌تر بود. دلیل این امر را می‌توان در نقش ممانعت کنندگی کیتوزان از جذب کامل چربی‌های جیره غذایی در دستگاه گوارش جستجو کرد (۴۲). لازم به ذکر است که افزایش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی تیمار ریزپوشـانی شده با کیتوزان نسبت به تیمـار ۴ و گروه کنتـرل در پایان دوره آزمایش می‌توانـد تأییدی بر تأثیر کیتوزان بر کاهش جذب چربی‌ها در دسـتگاه گوارش ماهیان مورد مطالعه در این تحقیق باشـد. به عبارت دیگر این امکان وجود دارد که کیتوزان با کاهش دادن جذب چربی‌ها و کاهش انرژی کافی و در نتیجه تجزیه پروتئین به منظور تولید انرژی شود که باعث کاهش کارایی پروتئین (PER)، کاهش کارایی غذا (FER) و افزایش شـاخص ضریب تبدیل غذایی در فیل ماهی شـده و کاهش رشد این ماهی را در پی داشته باشد. این نکته که کیتوزان در انسان هم با مکانیسـم جلوگیری از جذب چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها در روده به عنوان یک ماده ضد چاقی مطرح است(۳۱)، می‌تواند تأیید دیگری بـر نقش کیتوزان در عدم بهبود شـاخص‌های تغذیه‌ای فیل ماهی در این تحقیق باشـد. البته لازم به ذکر اسـت که این اثر روی شاخص‌های رشد لزوما به معنی کاهش اثرات پروبیوتیکی باکتری ریزپوشانی شده با نانوذرات آلژینات و کیتوزان نیست، زیرا در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است که ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیکی با پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر (مثل کیتوزان و آلژینات) باعث حفظ باکتری در شرایط لوله گوارش ماهی شده و برخی اثرات پروبیوتیکی باکتری را بهبود می‌بخشد و بعید نیست که سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی این باکتری (تحریک ایمنی ذاتی و افزایش مقاومت در برابر عوامل استرس زا و عفونی) بهبود یافته باشد. از طرف دیگر در برخی از مطالعات به عدم تأثیر باکتری‌های پروبیوتیکی بر شاخص‌های رشد ماهی اشاره شده است که در بالا به آن‌ها اشاره شد.

نتیجـه گیری: کاهش شـاخص رشـد تیمارهـای ۲ و ۳ (پروبیوتیک ریزپوشـانی شـده به دو روش مختلـف) می‌تواند از تقابـل دو عامل تأثیر گذار نتیجه شـده باشـد، اولا با توجه به حفظ بهتر پروبیوتیک در شـرایط لوله گوارش، نسـبت و کارایی باکتری در روده افزایش یافته اسـت ولی از طرفی خود کیتوزان و آلژینات همراه باکتری می‌تواند تأثیر محدود کننده بر شاخص‌های رشد داشته باشد. لذا جمع این دو اثر می‌تواند نتیجه نهایی را باعث شود که در تحقیق حاضر این تعادل به سمت کاهش رشد ماهی بوده است ولی نمی تواند نفی کننده اثر این روش ریزپوشانی در کارایی باکتری

ریزپوشانی شده باشد. در پایان با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان عنوان نمود که باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (بدون پوشش) به همراه غذا می‌تواند در بهبود عملکرد رشد بچه فیل ماهی نقش موثری داشته باشد اما ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی به دلیل محافظت از باکتری در برابر شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی روده توسط آلژینات/کیتوزان کارایی لازم را ندارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از مساعدت و همکاری صمیمانه مدیر کل محترم شیلات استان گلستان و مدیریت محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی اعلام می‌نمایند. همچنین از زحمات آقای عبدالوهاب کر تکنسین پرورش ایستگاه تحقیقاتی قره سو که در انجام این پروژه زحمات زیادی را تقبل نموده اند، سپاسگزارم.

References

1. Allan-Wojtas, P., Hansen, L.T., Paulson, A.T.(2008) Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. LWT-Food Sci Tech. 41: 101-8.
2. Aragon- Alegro, L.C., Alegro, J.A., Cardarelli, H.R., Chiu, M.C., Saad, S.M. (2007) Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. LWT-Food SciTech. 40: 669-75.
3. Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, A. (2008) Growth, Survival and gut Microbial load of Rainbow trout (*Oncho-rhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk J Fish Aquat Sci. 8: 43-48.
4. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vandrell, D. Muzquiz J.L.(2006) Review: The role of probiotics in aquaculture, Vet Microbiol. 114: 173-186.
5. Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y.(2009) Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos, Small. 5: 1897-1910.
6. Blottiere, H.M., Buecher, B., Galmiche, J.P., Cherbut, C. (2007) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceeding Nutri Soci. 62: 101-106.
7. Boonyo, W., Junginger, H.E., Waranuch, N., Polnok, A., Pitaksuteepong, T. (2007) Chitosan and trimethylchitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducingimmune responses to ovalbumin in mice followingnasal administration. J Cont Release. 121: 168-175.
8. Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A. (2004) Incorporation of bifidobacteriainto cheeses: challenges and rewards. Int Dairy J. 14: 375-387.
9. Chandramouli, V., Kailasapathy, K.P., peireis, J.M.(2004) An improved method of microencapsulationand its evaluation to protect lactobacillus spp. In simulated gastric conditions. J Microb Methods. 56: 27-35.
10. Cheba, B.A. (2011) Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. Global J Biotech Biochem. 6: 149-153.
11. Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A. (2010) Efficacy of whey protein gel networks, as potential viability- enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Microb Methods. 80: 231-241.
12. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S. (2004) Chitin andchitosan: Chemistry, properties and applications. J Sci Ind Res. 63: 20-31.
13. FAO. (2010) The state of world fisheries and aquaculture. NO:944.Rome.243.pp.
14. Geng, X., Dong, X., Tan, B., Yang, Q., Chi, S., Liu, H., Liu, X. (2011) Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance nonspecificimmunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish Shellfish Immunol. 31:400- 406.
15. Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. (2000) The use andselection of probiotic bacteria for use in the culture of *Larvalaquatic organisms*. Aquaculture. 191: 259-270.
16. Gopalakannan, A., Arul, V. (2006) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture. 255.:

179-187.
17. Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C., Heo, M. (2012) Immunomodulatory effects of chitin andchitosan enriched diets in *Epinephelus bruneusagainst* Vibrio alginolyticus infection. Aquaculture. 326: 46-52.
18. Huiyi, S., Weiting, Y., Meng, G., Xiudong, L., Xiaojun, M. (2013) Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. J Carbohydr polym. 96: 181-189.
19. Ichikawa, H., Kuroiwa, T., Inagaki, A., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S. Sakata, T. (1999) Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Digest Dis Sci. 44: 2119-2123.
20. IUCN. (1996) IUCN Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
21. Jafarian, H., Azari Takami, G., Kamali, A., Soltani, M., and Habibirezaei, M. (2007a) The use of probiotic bacillus bioencapsulated with *Artemia urmiana* nauplii for the growth and survival in *Acipenser persicus* larvae. J Agric Sci Nat Reso. 14: 77-87. (In Persian).
22. Jafarian, H., Soltani, M., Abedian, A.M. (2007b) The influence some of probiotic bacillus on feeding efficiency and nutrient body composition of Beluga (*Huso huso*) larvae. J Agri Sci Nat Reso. 14: 60-71.
23. Khalil, A.H., Mansour, E.H. (1998) Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. J Food Sci 63: 702-5.
24. Kono, M., Matsui, T., Shimizu, C.(1987) Effects of chitin, chitosan and cellulose as dietsupplements on the growth of cultured fish. Nippon Suisan Gakka. 53: 125-129.
25. 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: 737-43.
26. Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzman-Mendez, B.E., Lopez-Madrid, W. (2003) Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216: 193-201.
27. Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L. (2011) Effects of dietary b-1,3-glucan, chitosan or raffinoseon the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). Fish Shellfish Immunol. 31: 788-794.
28. Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L. Pan, Y. (2012) Effects of dietary chitosan oligosaccharidesand Bacillus coagulans on the growth, innateimmunity and resistance of koi (*Cyprinus carpiokoi*). Aquaculture. 342: 36- 41.
29. Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H., Balange, A.K. (2010) Effect of dietary chitosan on nonspecificimmune response and growth of Cyprinuscarpio challenged with *Aeromonas hydrophila*. Int Aquat Res. 2: 77-85.
30. Maria, A.A., Ana, I.B., Antonio, A.V., Miguel, A.C. (2014) Alginat/chitosan nanopartices for encapsulation and controlled release of vitaminB2. Int J Biol Macromol. 71: 141-146.
31. Melinda, M. (2012) Dietary Supplements for Improving Body Composition and Reducing Body Weight. Int J Sport Nutri Exer Metabol. 22: 139 -154.
32. Mohammadian, T., Alishahi, M. Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi.D., Tollabi, M., Rohanizadeh, S. (2015) Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. bulguricus on some immune-related parameters in *Tor grypus*. Aquacul Int.
33. Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S. (2007) Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iran J Biotech. 5: 1-18.
34. No, H., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosanoligomers with different molecular weights. Int J Food Microb. 74: 65-72.
35. Pelicano, E.R.L., Souza, P.A., Souza, H.B.A., Figueiredo, D.F., Boiago, M.M., Carvalho, S.R., Bordon, V.F. (2005) Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth pro-

moters. Revista Brasileira de Ciencia Accola. 7: 221-229.

36. Picot, A., Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteriain whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointeatinal conditions and in yoghurt. Int Dairy J. 14: 505-515.
37. Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N., Maita, M. (2011) Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Res Vet Sci. 91: 92-97.
38. Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z., Gao, X. (2002) Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. Int J Biol Macromol. 31: 111-117.
39. Rokka, S., Rantamaki, P. (2010) Protecting probiotic bacteria by microencapsulation:challenges for industrial applications. Euro Food Res Tech. 231: 1-12.
40. Seferian, P.G., Martinez, M.L. (2001) Immunestimulating activity of two new chitosan containingadjuvant formulations. Vaccine. 19: 661-668.
41. Sharifzadeh, M.B., Hosseinzadeh, M.J., Younesi, H. (2012) Whey Processing with nano chitosan, World Appl Sci J. 19: 530-537.
42. Shiau, S.Y., Yu, Y.P. (1999) Dietary supplementation of chitin and chitosan depressesgrowth in Tilapia, *Oreochromis niloticus_O. auratus*. Aquaculture. 179: 439-446.
43. Tafi, E., Meshkini, S. (2015) The effect of different levels of Chitosan on the growth parameters of Rainbow truot (*Onchorhynchus mykiss*). J Anim Biol. 4: 35-44.
44. Vazquez, J.A., Gonzalez, M.P., Murado, P. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture. 245: 149-161.
45. Wang, Y.B., Xu, Z. (2006) Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim Feed Sci Tech. 127: 283-29.
46. Yazdani, A., Shakorian, M., Pourali, H. M., Sayed Hassani, M. H., Paykaran Man, N., Yegane, H. (2011) Extension and rearing of *Huso huso* for production of meat. Final report. Int Sturgeon Res Insti. p. 57. (In Pesian)
47. Yen, M.T., Yang, J. H., Mau, J.L. (2008) Antioxidantproperties of chitosan from crab shells. Carbohydr Polym. 74: 840-844.

Comparison Effects of *Lactobasillus bulgaricus* Microencapsulated by Nano Alginat/Chitosan on Growth Performance and Feed Efficiency Great Sturgeon (*Huso Huso*) Juveniles

Hosseini, S.S.[1*], Alishahi, M.[2], Amini, K.[3], Abbaspour, M.[4], Ghorbanpour, M.[5], Mohammadian, T.[2]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[3]*Inland Waters Aquatics Stocks Research Center Gorgan, Gorgan, Iran*

[4]*Targeted Drug Delivery Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

[5]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran*

(Received 2 October 2017, Accepted 18 December 2018)

Abstract:

BACKGROUND: In aquaculture the fast growth, high feed efficiency and increased resistance against pathogens are favorable. One of the suitable approaches for improving the growth indices and resistance against pathogens is the application of probiotic bacteria. **OBJECTIVES:** The present study was conducted to evaluate the effect of nano/microencapsulated *Lactobasillus bulgaricus* by nano alginate/chitosan on the growth rate and feeding efficiency of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. **METHODS:** This experiment was conducted in a completely random design in four groups and group (5) with triplicate. 375 fish weighing (27.28±2.86 gr mean±SD), were randomly divided in to five equal groups in triplicates. The test groups were as follows: fish in T1 were fed with alginate/chitosan without bacterium, fish in T2 were fed with encapsulated bacteria with emulsification method, fish in T3 were fed with encapsulated bacteria with Ionicgelation method, fish in T4 were fed with only bacteria and control group. The fish were fed 3% of body weight per day. **RESULTS:** The results showed the highest feed conversion ratio (FCR) was measured in T3 (1.64±0.11) and the lowest was observed in T4 (1.14±0.06).The highest values of SGR, PER, FER in T4 were seen among the treatments at days 30 and 60. **CONCLUSIONS:** According the result, nanoalginat/Chithosan used for encapsulation of probiotics can be lead to decrease in growth performance compared to the other treatments.

Keyword: Probiotic, Nanocapsulate, *Husu huso*, Growth parameters

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Combining ratio used by Faradaneh Co. for Sturgeon fishes.

Table 2. Comparison of growth indices between treatments during 2 months of feeding with experimental diet (results are reported based on Means±SD).

***Corresponding author's email: samad_hosseini@ymail.com, Tel: 0611-3355110, Fax: 021-????**