اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی بچه‌ماهیان انگشت‌قد سوروم (*Heros severus*)

- **نیلوفر فلک‌زاده*:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال، صندوق‌پستی: 181- 19735
- **نرگس موركی:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال، صندوق‌پستی: 181- 19735
- **امیرعلی انوار:** گروه بهداشت، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: **775-14515**
- **شاپور کاکولکی:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، صندوق‌پستی: 6116- 14155

تاریخ دریافت: خرداد 1393 تاریخ پذیرش: شهریور 1393

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابي اثر کاربرد *Pediococcus acidilactici* (CNCM-MA 18/5M, Lallemand, France) بر شاخص‌هاي رشد و پارامترهاي خوني ماهی زینتی سوروم (*Heros severus*) انجام شد. به این منظور، 120 عدد سوروم با میانگین وزن 0/01±0/53 گرم و طول اولیه 0/03 ± 27/2 میلی‌متر تهیه و به‌طور تصادفي در 12 آکواریوم رهاسازي شدند. پس از دو هفته دوره سازگاری، آکواریوم‌ها به چهار گروه هر کدام با سه تکرار تقسیم و ماهیان با چهار جیره آزمایشي ایزوکالریك و ایزونیتروژنوس حاوي سطوح 1، 2 و 3 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره به‌مدت 12 هفته تغذیه گردیدند، گروه شاهد فاقد مکمل غذایی بود. در طول دوره، ماهیان هر 15 روز زیست-سنجی شدند و در پایان دوره، خون‌گیری صورت پذیرفت. نتایج نشان دادند تیمارهای پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد تاثیر قابل توجهی بر روی کارآیی رشد، بقاء و شاخص‌های خونی داشتند (P<0/05). ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 2 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره بهترین کارآیی رشد را داشتند و این تفاوت در مقایسه با سایر گروه‌ها معنی‌دار بود (P<0/05). در پایان دوره 90 روز پرورش، از روش نات هریک جهت شمارش گلبول‌های قرمز و سفید استفاده گردید. برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیان مت هموگلوبین استفاده گردید و میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت محاسبه گردید. شاخص‌های خونی در ماهیان تغذیه شده با مکمل در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند (P<0/05). بیشترین مقدار شاخص‌های خونی در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی 2 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان دادند که پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در سطح 2 گرم در کیلوگرم غذای خشک می‌تواند تاثیرات قابل توجهی بر روی کارآیی رشد، بقاء و پارامترهای خونی در بچه‌ماهیان انگشت‌قد سوروم (*Heros severus*) داشته باشد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های اسیدلاکتیک، پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*، شاخص‌های رشد، پارامترهای خونی، ماهی سوروم

مقدمه

امروزه آکواریوم و ماهیان زینتی به‌خوبی توانسته‌اند در این دنیای صنعتی، جای خود را در خانه‌های مردم باز کنند، به‌طوری‌که این شاخه از علم شیلات به یک صنعت بزرگ و تجارتی سودآور تبدیل شده است (Ghosh و همکاران، 2008). از آن‌جائی‌که اهمیت اقتصادی ماهیان آکواریومی کم‌تر از ماهیان خوراکی نیست، از این رو بررسی جنبه‌های مختلف پرورش آن‌ها اهمیت دارد که شامل رشد، بقاء و هم‌چنین راه‌های مقاومت ماهیان زینتی در برابر بیماری‌ها می‌باشد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011). براي کارآیي بهتر جیره غذایي و نیز بهبود کارآیي رشد، سلامت، زیبایي آبزي، افزایش پایداری پلت، سلامت جیره و هم‌چنین طعم و مزه غذا می‌توان از مکمل‌ها و افزودني‌هاي غذایي استفاده نمود، از جمله این مکمل‌ها می‌توان به پروبیوتیک‌ها اشاره نمود. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Faaarnilooo@yahoo.com

زنده‌ای هستند، که از طریق بهبود فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند (Ajiboye و Faturoti، 2011). اثرات پروبیوتیک‌ها در پرورش ماهیان خوراکی طی تحقیقات بسیاری به اثبات رسیده است (Irianto و Austin، 2002)، درحالی‌که درخصوص ماهیان زینتی تحقیقات کمی صورت گرفته است (Avella و همکاران، 2010؛ Ghosh و همکاران، 2008).

باکتری‌های اسیدلاکتیک محبوب‌ترین نوع باکتریایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* استفاده گردید، که یک باکتری اسیدلاکتیک می‌باشد، در بررسی‌هایی که بر روی این سویه در آبزیان صورت پذیرفت، گزارش گردید که ایجاد کلونی در دستگاه گوارش توسط این باکتری در تمام گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک با موفقیت صورت پذیرفت. ایجاد کلونی موفق در لوله گوارش توسط *P. acidilactici* منجر به یک روند افزایشی در رشد، بقاء و تحریک سیستم ایمنی می‌گردد (Ferguson و همکاران، 2010). از آن‌جاکه، ماهیان زینتی از این نظر به‌ندرت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، بنابراین پتانسیل کاربرد این سویه در ماهیان زینتی نامشخص باقی‌مانده است. پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* از طریق تولید pediocins و اسیدهای آلی (مانند لاکتیک و اسیدلاکتیک) منجر به عملیات آنتاگونیستیک در مقابل تعداد زیادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌گردد (Ferguson و همکاران، 2010). پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین‌ها از طریق تولید آنزیم‌هاي گوارشي نظير آميلاز و پروتئاز و تولید مواد مغذي ضروري (ویتامین‌ها، اسیدهاي چرب با زنجیره کوتاه) سبب افزایش میزان هضم و جذب مواد غذايي شده که این خود سبب بهبود شاخص‌هاي رشد، و بهبود ضريب تبديل غذايي مي‌گردد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011).

مطالعه فاکتورهای خونی، به‌عنوان یک ابزار پاراکلینیکی و یک شاخص برای بررسی وضعیت سلامت و تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک ماهی‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (Ferguson و همکاران، 2010). خون حساس‌ترین بافت بدن نسبت به تغییرات ایجاد شده در موجودات زنده بوده و در تحقیقات ماهي‌شناسي کاربرد وسيعي دارد. تحقیقاتی در زمینهٔ تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر روی شاخص‌های خونی صورت گرفته است از جمله: قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Merrifield و همکاران، 2009) و تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Ferguson و همکاران، 2010). اگرچه فعالیت‌های انجام شده در زمینه کاربرد پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری بسیار زیادند، اما پیشینه چنین تحقیقاتی در ماهیان آکواریومی بسیار کم‌رنگ بوده و حتی در مواردی مانند سوروم دیده نمی‌شود، که علت آن را می‌توان در ناشناخته بودن صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی دانست (پورداود و همکاران، 1389). با توجه به این‌که این موضوع مدت زمان زیادی است که در کشورهای بزرگ تولیدکننده آبزیان مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته و با عنایت به فواید بسیار زیادی که این محصولات در صنایع آبزی‌پروری دارند و نیز با توجه به رشد روز افزون صنعت آبزی‌پروری در ایران، نیاز به این قبیل پژوهش‌ها احساس می‌شود.

گونه *Heros severus* متعلق به خانواده Cichlidae حدود سی سال پیش وارد ایران شد و به سبب ظاهر و زیبایی آن یکی از گونه‌های پرطرفدار در میان ماهیان زینتی محسوب می‌شود. با توجه به این‌که خانواده Cichlidae علاوه بر گونه‌های تزیینی، انواع معروف پرورشی جهت استفاده غذایی را در خود دارد لذا می‌توان نتایج حاصله را به آن‌ها نیز تعمیم داد (پورداود و همکاران، 1389). سوروم نسبت به شرایط محیطی حساس است و به‌همین جهت، حضور آن‌ها در یک محیط، کیفیت بالای شرایط زیستی را مشخص می‌کند. لذا این گونه، به‌عنوان

نماینده بسیاری از ماهیان آکواریومی در تحقیقات، توصیه می‌شود (Johnson و همکاران، 1996).

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر گونه باکتریایی *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، شاخص‌های تغذیه‌ای و فاکتورهای خونی ماهی زینتی سوروم (*Heros severus*) و تعیین دوز موثر آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: در سال 1391 به‌منظور بررسی تاثیر پروبیوتیک تعداد 120 عدد بچه‌ماهی سوروم (*Heros severus*) با میانگین وزن اولیه 0/53±0/01 گرم و میانگین طول کل 27/2±0/03 میلی‌متر که همگی از یک والد بودند از مرکز تکثیر و پرورش واقع در شهریار تهیه و در قالب 4 تیمار هر کدام با سه تکرار در 12 آکواریوم (هر کدام دارای 10 عدد ماهی) با ابعاد 40×30×50 به‌طور کاملاً تصادفی در مرکز پرورش ماهیان زینتی واقع در تهرانپارس رهاسازی شدند. پس از سپری شدن دو هفته دوره سازگاری، تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی تهیه شده آغاز گردید. آب مورد استفاده برای پرورش ماهیان در طول دوره از نقطه نظر فاکتورهای دما، اکسیژن محلول، pH، نیتریت و سختی مورد پایش قرار گرفت و فاکتورهای فوق در قالب مقادیر میانگین در جدول 1 ارائه شده است. برای حفظ کیفیت آب در طی دوره از فیلتر شنی استفاده شد و 40 درصد حجم کل آب هر سه روز یکبار تعویض گردید.

جدول 1: دامنه تغییرات پارامترهای آب آکواریوم ها در طول دوره پرورش

فاکتور	pH	دما (سانتی‌گراد)	اکسیژن - محلول (میلی-گرم/لیتر)	نیتریت (میلی-گرم/لیتر)	سختی کل
مقدار	6/7-5/5	25/0±36/05	6/8-5	8±34/18	37±315/74

ساخت جیره آزمایش: جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان با استفاده از نرم‌افزار Win feed2/8 و با استفاده از مواد اولیه به‌شرح جدول 2 تهیه گردید. سپس پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (Lallemand, France CNCM-MA 18/5 M,) در سه سطح مختلف شامل: تیمار یک: ماهیان تغذیه شده با یک گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره (T_1)، تیمار دو: ماهیان تغذیه شده با دو گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره (T_2)، تیمار سه: ماهیان تغذیه شده با 3 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره (T_3)، به‌عنوان مکمل به جیره پایه ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس اضافه گردید. گروه شاهد (C) ماهیان تغذیه شده با جیره پایه فاقد پروبیوتیک بودند. پس از بالانس جیره توسط نرم‌افزار Win feed 2/8، مقادیر تعیین شده اقلام غذایی در جیره‌های غذایی، وزن گردیدند و سپس مخلوط گردیدند. پس از مخلوط کردن مواد اولیه خشک، آب و مقداری از روغن به مواد خشک اضافه گردید تا یک خمیر نچسب به وجود آمد. خمیر تهیه شده به رشته‌های اکسترود تبدیل و به مدت ۸ ساعت در دستگاه آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و خشک شد و در داخل کیسه‌های پلاستیک در یخچال نگه‌داری شدند. جیره‌های غذایی هر ۲ هفته یکبار با توجه به اندازه دهان ماهیان خورد شده و با الک مورد نظر الک شد. هر روز قبل از غذادهی به ماهیان پروبیوتیک مورد نظر در بخشی از روغن جیره حل شده و به‌طور یکنواخت بر روی وعده غذایی پاشیده می‌شد. تغذیه ماهیان متناسب با میزان اشتها روزانه، به میزان ۵ درصد از وزن بدن (Javaher و Suman، 2008) در ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶ (سه نوبت) انجام می‌گرفت.

جیره‌هاي مورد نظر پس از آماده‌سازي براي حصول اطمینان از کیفیت و ترکیب تقریبي به آزمایشگاه منتقل شدند و میزان پروتئین با استفاده از روش کجلدال و چربي خام مطابق با روش سوکسله توسط دستورالعمل AOAC (1990) اندازه‌گیری گردید. رطوبت، فیبر، خاکستر، کربوهیدرات نیز به‌روش استاندارد AOAC (1990) اندازه‌گیری شد (Williams، 1990).

پس از اتمام دوره پرورش، به‌منظور بررسی عملکرد رشد در تیمارهای مختلف، با توجه به‌مقادیر طول و وزن ماهیان در زیست‌سنجي‌های انجام‌شده (هر 15 روز یک‌بار)، از شاخص‌های رشد استفاده گردید.

جدول 2: اجزای غذایی و آنالیز شیمیایی تقریبی جیره‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک بر حسب درصد

مواد غذایي	تیمار 1	تیمار 2	تیمار 3	شاهد
آرد ماهي	47/5	47/5	47/5	47/5
آرد مخمر	11/43	11/43	11/43	11/43
گلوتن گندم	8/8	8/8	8/8	8/8
آرد گندم	7/05	7/05	7/05	7/05
سبوس گندم	7/56	7/56	7/56	7/56
دي کلسیم فسفات	1	1	1	1
روغن سویا	1/7	1/7	1/7	1/7
افزودنی*	15	15	15	15
پروبیوتیک (گرم در کیلوگرم)	1	2	3	-
آنالیز شیمیایی:				
ماده خشک (%)	92/7	92/7	92/7	92/7
پروتئین خام	40/3	40/3	40/3	40/3
چربی خام	10/7	10/7	10/7	10/7
فیبر	2/9	2/9	2/9	2/9
خاکستر	9/1	9/1	9/1	9/1
کربوهیدرات	8/8	8/8	8/8	8/8
انرژی	244/52	244/52	244/52	244/52

***مواد افزودنی شامل:** آستاگزانتین 3 درصد، آنتی‌اکسیدان 0/1 درصد، هم‌بند 5 درصد، مخلوط مواد معدنی 1/5 درصد، مخلوط مواد ویتامینی 2 درصد، ضد قارچ 0/4 درصد، متیونین 1 درصد، لیزین 1 درصد، پودر سیر 1 درصد

شاخص‌های رشد از طریق فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Ferguson و همکاران، 2010؛ Merrifield و همکاران، 2009):

وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (WG)

100 × [وزن اولیه (گرم) / وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم)] = درصد افزایش وزن بدن (%WG)

100 × [تعداد روزهای غذادهی/ لگاریتم وزن اولیه (گرم)- لگاریتم وزن نهایی (گرم)] = ضریب رشد ویژه وزنی (SGRw)

وزن بدن (گرم) / غذای مصرفی (گرم) = ضریب تبدیل غذایی (FCR)

100 × [وزن نهایی ماهیان در انتهای پرورش (گرم) / طول نهایی ماهیان در انتهای پرورش (سانتی‌متر)] =ضریب چاقی (CF)

100 × (تعداد ماهیان در وزن اولیه / تعداد ماهیان در وزن نهایی) = درصد بقاء (SR)

بررسی فاکتورهای خونی: در پایان دوره 90 روزه پرورش، پس از گذشت 24 ساعت از زمان قطع تغذیه، 8 تا 10 عدد از ماهیان هر آکواریوم به‌طور تصادفی صید گردید و ماهیان به‌طور زنده در پلاستیک‌های دوجداره مخصوص حمل و نقل بچه‌ماهیان، با رعایت اصول حمل و نقل به آزمایشگاه پلی‌کلینیک تخصصی حیوانات خانگی سعادت‌آباد انتقال یافتند. سپس ماهیان را خشک کرده و با استفاده از تیغ، ساقه دمی آن‌ها قطع گردید. پس از آن، با لوله‌های موئینه آغشته با ماده ضدانعقاد خون هپارین، خون‌گیری صورت پذیرفت. برای شمارش گلبول قرمز و سفید با استفاده از سمپلر و محلول رقیق‌کننده نات هریک خون را رقیق نموده و با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار اقدام به شمارش گلبول قرمز و سفید گردید (Firouzbakhsh و همکاران، 2011). برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیان مت هموگلوبین استفاده شد و میزان هماتوکریت از روش میکرو هماتوکریت (Blaxhall، 1972) محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری شاخص‌های MCV، MCH و MCHC از فرمول‌های زیر استفاده شد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011).

حجم متوسط گلبول قرمز خون (MCV) (μm3):

$[HCT \div RBC\ (million)] \times 10$

هموگلوبین متوسط گلبول قرمز خون (MCH) (pg/cell):

$[Hb \div RBC\ (million)] \times 10$

غلظت متوسط هموگلوبین سلول قرمز (MCHC) (g/dl):

$(Hb \div Hct) \times 100$

آنالیز آماری: آنالیز آماری با ورود داده‌های حاصل از انجام زیست‌سنجی و آزمایش خون به صفحات گسترده Excel آغاز گردید. در نرم افزار اکسل میانگین داده‌ها محاسبه گردید و سپس به نرم افزار SPSS نسخه 13 منتقل شد تا از نظر وجود میزان اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بررسی شوند. با استفاده از آزمون Kolmogrorov-Smirnov نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One-Way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون Post hoc LSD در سطح معنی‌داری ($P<0/05$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تکرارها استفاده گردید.

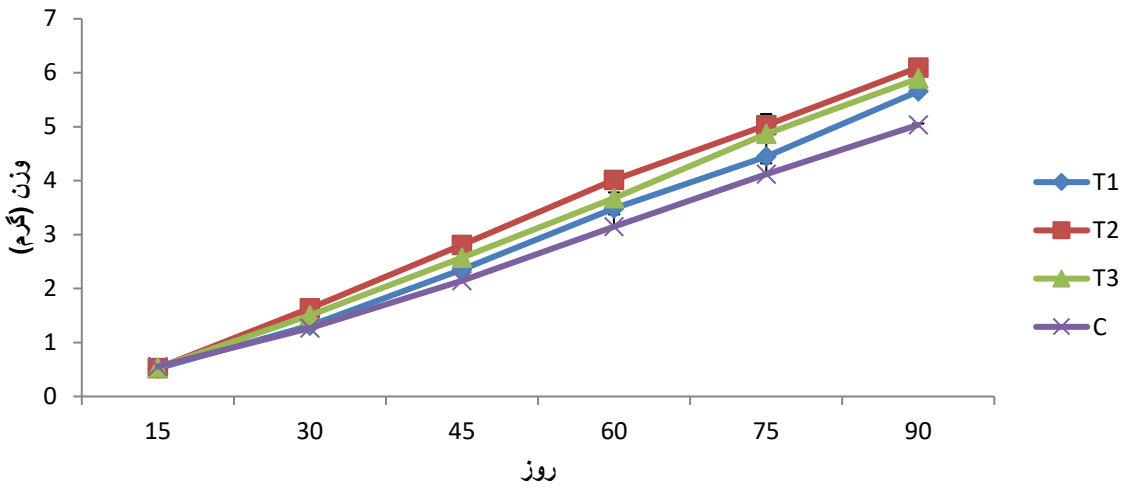
نتایج

بازده رشد، میزان بقاء و شاخص تغذیه: در شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی به لحاظ وزنی وجود نداشت و سه گروه مورد بررسی، به لحاظ میانگین وزنی از وضعیت یکسانی برخوردار بودند ($P>0/05$). نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد که ماهیان هر سه تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پروبیوتیک پس از ۹۰ روز، در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری را از نقطه نظر افزایش وزن نشان دادند ($P<0/05$)، به گونه‌ای که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 2 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره از وزن بیشتری در مقایسه با دو تیمار دیگر و گروه شاهد برخوردار بودند ($P<0/05$) (شکل1). همان‌طورکه در شکل2 مشخص شده است در شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی به لحاظ طول اولیه وجود نداشت و چهار گروه مورد بررسی، به لحاظ میانگین طولی از وضعیت یکسانی برخوردار بودند ($P>0/05$). پس از گذشت 90 روز از تغذیه ماهیان در پایان دوره اختلاف معنی‌داری در میزان طول کل ماهیان گروه‌های شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک مشاهده شد ($P<0/05$).

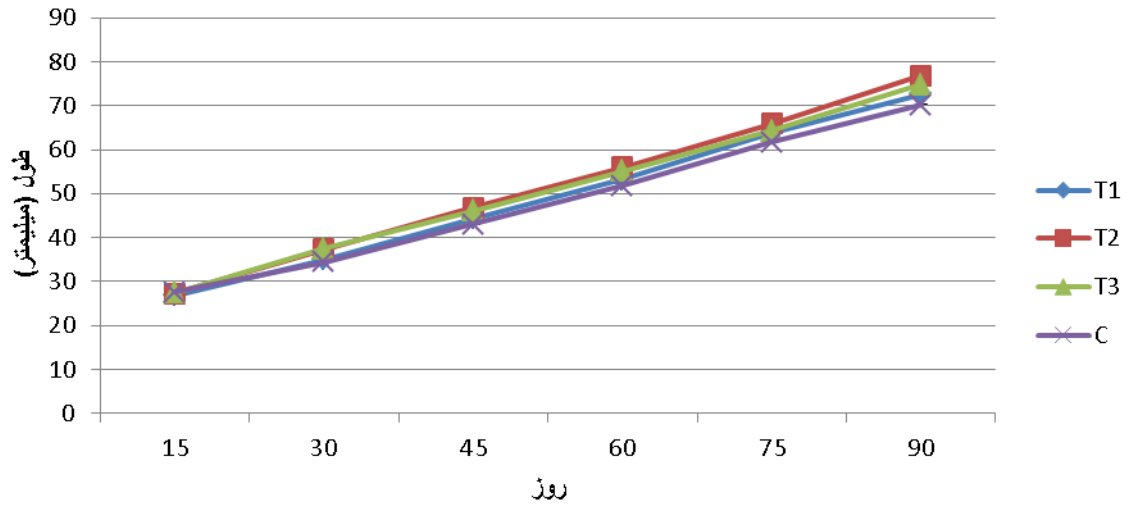
جدول 3: مقایسه شاخص‌های رشد، تغذیه و درصد بقاء (میانگین± انحراف معیار) ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح متفاوت پروبیوتیک و گروه شاهد طی 90 روز پرورش

فاکتور	تیمار 1	تیمار 2	تیمار 3	شاهد
افزایش وزن (گرم)	5/13±0/13 b	5/55±0/04 a	5/35±0/10 ab	4/48±0/03 c
درصد افزایش وزن بدن	998/1±95/74 a	1026/8±42/95 a	1008/0±66/45 a	815/2±49/42 a
افزایش طول (سانتی‌متر)	45/76±0/33 b	49/63±0/26 a	47/40±0/30 b	42/66±0/25 c
ضریب رشد ویژه وزنی	2/65±0/09 ab	2/68±0/04 a	2/26±0/06 ab	2/45±0/06 b
فاکتور وضعیت	1/47±0/03 a	1/34±0/03 b	1/40±0/03 ab	1/45±0/02 a
ضریب تبدیل غذایی	1/58±0/04 b	1/46±0/01 a	1/51±0/03 ab	1/81±0/01 c
درصد بقاء	100±0/00 a	100±0/00 a	100±0/00 a	93/33±3/33 b

وجود حروف مشابه نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>0/05)



شکل 1: نمودار روند تغییرات وزن ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی 90 روز پرورش



شکل 2: نمودار روند تغییرات طول کل ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک و گروه شاهد طی 90 روز پرورش

فاکتورهای خونی:

فاکتورهاي خوني محاسبه شده براي ماهيان سوروم تغذيه شده با سطوح مختلف پروبيوتيك در اين تحقيق در جدول 4 ارائه شده است. افزايش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهیان سه تیمار تغذیه شده باپروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$). ماهیان تغذیه شده با جيره حاوي 2 گرم پروبيوتيک در کيلوگرم جيره دارای بیشترین تعداد گلبول قرمز در مقایسه با سایر تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و شاهد بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). مقدار هموگلوبین به‌ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جيره حاوي 2 و 3 گرم پروبيوتيک در کيلوگرم جيره به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزايش مي‌يابد و پس از آن در ماهيان تغذيه شده با جيره حاوي 1 گرم پروبيوتيک و شاهد به‌طور معني‌داري ($P<0/05$) کاهش مي‌يابد. افزايش معنی‌داری در ميزان هماتوکريت ماهيان سه تيمار تغذيه شده با پروبيوتيک در مقايسه با گروه شاهد مشاهده گرديد ($P<0/05$). در ماهيان تغذيه شده با جيره غذايی حاوی 2 گرم پروبيوتيک در کيلوگرم جيره دارای بيشترين ميزان هماتوکريت در مقايسه با ساير تيمارهای تغذيه شده با پروبيوتيک بود و اين اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). ميزان MCH در تيمارهای تغذيه شده با پروبيوتيک در مقايسه با گروه شاهد کاهش يافته بود به‌طوری‌که کم‌ترين مقدار در تيمار 2 مشاهده گرديد، اما اين اختلاف معنی‌دار نبود ($P>0/05$). کاهش معنی‌داری در مقدار MCV هر سه تيمار تغذيه شده با پروبيوتيک در مقايسه با گروه شاهد مشاهده گرديد ($P<0/05$). ماهيان تغذيه شده با جيره غذايی حاوی 2 گرم پروبيوتيک در کيلوگرم جيره دارای کم‌ترين مقدار MCV در مقايسه با ساير تيمارهای تغذيه شده با پروبيوتيک بود که اين اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). ميزان MCHC در تيمارهای پروبيوتيک در مقايسه با گروه شاهد افزايش يافت که اين اختلاف در تيمار 2 در مقايسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($P>0/05$). حداکثر تعداد گلبول‌های سفيد در تيمار 2 مشاهده گرديد که اين افزايش از نظر آماری در مقايسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($P<0/05$). همچنين تعداد گلبول‌های سفيد در ساير گروه‌های تغذيه شده با پروبيوتيک در مقايسه با گروه

شاهد افزایش یافته بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0/05$).

جدول4: مقایسه پارامترهاي خون‌شناسي (میانگین ± انحراف معیار) ماهیان سوروم تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیك و شاهد طي 90 روز پرورش

فاکتور	تیمار 1	تیمار 2	تیمار 3	شاهد
گلبول قرمز (تعداد در میلی‌متر مکعب × 10^6)	4/21±0/06 c	6/37±0/08 a	5/07±0/29 b	3/05±0/14 d
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	8/18±1/25 b	10/76±0/50 a	9/15±0/58 ab	6/0±75/12 b
هماتوکریت (درصد)	32/23±0/55 b	34/88±0/22 a	33/19±0/35 b	29/96±0/35 c
MCH (پیکوگرم)	19/47±3/24 a	16/86±0/61 a	18/20±1/84 a	22/26±1/47 a
MCHC (گرم در دسی‌لیتر)	25/45±4/14 ab	30/85±1/40 a	27/53±1/51 ab	22/55±0/57 b
MCV (فمتولیتر)	76/42±0/40 b	54/71±0/52 a	65/86±3/69 c	98/56±4/62 d
گلبول سفید (تعداد در میلی‌متر مکعب ×10^3)	14/22±1/17 ab	16/22±1/17 a	15/55±1/45 a	11/94±0/03 b

وجود حروف مشابه نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P>0/05$)

بحث

شاخص‌هاي رشد، بقاء و تغذیه:

با توجه به مشاهده اثر پروبیوتیک در بهبود بقا، کاهش استرس‌های محیطی، محافظت در برابر عوامل بیماری‌زا و مزایای تغذیه‌ای آن‌ها، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند نقش مهمی در تسهیل نگه‌داری و پرورش ماهیان زینتی داشته باشد (Merrifield و همکاران، 2009). اثر *Pediococcus acidilactici* براي طیفي از انواع آبزیان (Castex و همکاران، 2009؛ Merrifield و همکاران، 2009) مورد ارزیابي قرار گرفته است، اما در خصوص ماهیان زینتي گزارشي در دست نیست (Firouzbakhsh و همکاران، 2011). با توجه به ماهیت مبهم نتایج به‌دست آمده تاکنون و به‌دلیل سوالات بسیاری که بدون پاسخ باقی‌مانده است، پتانسیل کاربرد پروبیوتیک *P. acidilactici* در ماهیان زینتی همچنان مبهم باقی‌مانده است، این باکتری دارای طیف وسیعی از مزایای بالقوه است که هنوز در دست بررسی است. در این تحقیق، نتایج نشان دادند که سوروم تغذیه شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* کارآیی رشد بهتری را در مقایسه با گروه شاهد دارا بودند که این تفاوت معنی‌دار بود.

به‌طور مشابه پورداود و همکاران (1389)، گزارش نمودند که ماهیان سوروم (*Heros severus*) تغذیه شده با پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری در میزان افزایش وزن نشان دادند و به‌طور مشابه بیش‌ترین وزن به‌دست آمده در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا گزارش شده است. هم‌چنین، مدنی و همکاران (1392) با بررسی که بر روی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*) با میانگین وزنی 3/93 گرم به‌مدت 84 روز انجام دادند، عملکرد رشد بهتری را در تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک *P. acidilactici* در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند، که این تفاوت معنی‌دار بود.

Gatesoupe (2002) افزایش وزن را در لاروهای pollock (*Pollachius virens*) تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با *P. acidilactici* مشاهده نمود. Anderson (2013) در بررسي پروبیوتیك *P. acidilactici* بر فلور میکروبي ماهي قزل‌آلا با میانگین وزني 311 گرم به مدت 4 هفته تفاوت معني‌داري را در رشد این

ماهي مشاهده كرد.
پروبيوتيک *Pediococcus acidilactici* در اين تحقيق توانست به‌ميزان قابل توجهی بر معيارهای رشد تاثير گذارد و عملكرد رشد را بهبود بخشد، مطالعات صورت گرفته مبين اين موضوع است كه اين ميكروارگانيسم ها در روده آبزی مورد مطالعه، ازطريق ترشح مواد خارج سلولی نظير آنزيم های گوارشی باعث هضم و جذب بهتر غذا در روده ماهی می‌گردند (Ghosh و همكاران، 2008). به‌طوركلی نحوه مكانيسم عمل پروبيوتيک‌ها در افزايش رشد و توليد به اين صورت می‌باشد كه پروبيوتيک‌ها با مهيا نمودن شرايط مساعد برای رقابت تغذيه‌ای و بهبود فعاليت ميكروارگانيسم های مفيد دستگاه گوارش، و كمک به فعاليت آنزيم ها برای گوارش، موجب افزايش كاتابوليسم و هضم مواد غذايی می‌شوند، كه در نهايت منجر به افزايش ميزان اشتها و افزايش تغذيهٔ ميزبان به‌دليل توليد مكمل‌های آنزيم های گوارشی می‌شوند (Irianto و Austin، 2002)، كه اين امر در نهايت موجب افزايش سرعت و ميزان رشد می‌گردد. هم‌چنين از طريق توليد ويتامين‌ها و سم‌زدايی جيره غذايی (توليد تركيبات مسمويت‌زدا) و تجزيه تركيبات غيرقابل هضم در غذا، موجب افزايش اشتها و ايجاد شرايط تغذيه‌ای بهتر در آبزی می‌شوند. علت كاهش رشد درماهيان تغذيه شده با جيره حاوي 3 گرم پروبيوتيک در كيلوگرم جيره غذايی درتحقيق حاضرمي‌تواندبه اين دليل باشد كه استفاده بيش از حد از پروبيوتيک‌ها منجر به تداخل در متابوليسم طبيعي بدن و درنتيجه كاهش رشد در ماهيان اين گروه نسبت به ساير تيمارها باشد كه البته اين مورد نيازمند بررسي بيشتر مي‌باشد. در مقادير بيش از حد پروبيوتيک، اثرات مثبت آن‌ها كاهش می‌يابد، زيرا امكان دارد باعث رقابت بين ميزبان و باكتری بر سر مواد غذايی شود، هم‌چنين باكتريوسين توليد شده توسط باكتری ممكن است در غلظت‌های بالا سبب كشته شدن خود باكتری شود (Irianto و Austin، 2002).

يكی از فاكتورهای مؤثر در اقتصادی بودن فرآيند پرورش آبزيان پايين بودن ضريب تبديل غذا (FCR) می‌باشد، چراكه كاهش بيشتر ضريب تبديل غذايی علاوه بر كاهش هزينه های توليد غذا و كاهش عمل غذادهی به سبب مقدار كم‌تر غذادهی، از آلودگی ثانويه آب محيط پرورش و به‌تبع آن كاهش پارامترهای كيفی آب جلوگيری خواهد كرد (Falahatkar و همكاران، 2006). در تحقيق حاضر، اختلاف معنی‌داری در ميزان ضريب تبديل غذايی بين ماهيان تغذيه شده با جيره حاوی پروبيوتيک در مقايسه با گروه شاهد، مشاهده شد. ميزان SGRنيز در ماهيان تغذيه شده با جيره هاي حاوي پروبيوتيك نسبت به گروه شاهد بيشتر بود. مطالعات گوناگونی روی پروبيوتيک در سال‌های گذشته منتشر شده است كه گويای اثر آن بر كاهش ضريب تبديل غذايی و افزايش SGR در آبزيان می‌باشد. Abraham و همكاران (۲۰۰۸) در ماهی طلايی (*Carassius auratus*) و دم شمشيری (*Xiphophorus helleri*) تغذيه شده با پروبيوتيک *Lactobacillus* sp. و *Bacillus* sp. نتايج مشابهی به‌دست آوردند. در ماهيان زينتی زنده‌زا *Poecilia reticulata*، *P. sphenops*، *Xiphophorus helleri*، *X. maculatus* تغذيه شده با مكمل پروبيوتيک *Bacillus subtilis* مقادير FCR پايين و SGR بالا مشاهده گرديد اين امر نشان می‌دهد كه اضافه نمودن پروبيوتيک‌ها سبب بهبود استفاده از جيره غذايی می‌گردد (Ghosh و همكاران، 2008). Castex و همكاران (2009) در بررسي رژيم غذايي ميگوي *Litopenaeus stylirostris*كه با جيره حاوي CFU/g 10^6 و 10^7 پروبيوتيک *Pediococcus acidilactici* تغذيه شده بود، مشاهده كردند كه ضريب تبديل غذايي در انتهاي آزمايش‌نسبت به گروه شاهد به‌طور معني‌داري كاهش يافته است. با توجه موارد بالا می‌توان چنين بيان نمود كه افزودن مكمل پروبيوتيكی به جيره ماهيان، موجب افزايش بهره‌وری از غذا و افزايش قابليت هضم پروتئين، نشاسته و چربی می‌شود كه اين امر موجب كاهش مقدار غذای مورد نياز

برای افزایش رشد می‌گردد و موجب رشد بیشتر و ضریب تبدیل غذایی بهتر می‌گردد که این امر موجب کاهش هزینه‌های تولید می‌شود (Yanbo و Zirong، 2006).

با توجه به این‌که عمده‌ترین مخاطراتی که پرورش‌دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان ماندگاری آبزی خصوصاً در مراحل اولیه زندگی می‌باشد؛ لذا بالا بردن و ارتقای سیستم ایمنی به‌ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان در این راستا می‌باشد (Ghosh و همکاران، 2008). ایجاد خواص سلامت بخش پروبیوتیک‌ها اساساً مدیون اثرات سرکوب کننده آن‌ها بر فلور مضر روده و حفظ و بهبود توازن این فلور به نفع خود و یا ترشح ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها که مانع از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد، می‌باشد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011). به‌طور مشابه پورداود و همکاران (۱۳۸۹) بیان نمودند که بررسی تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک (*Saccharomyces cerevisiae*) بر زنده مانی، نشان‌دهنده آن است که پروبیوتیک تاثیر خود را در سطوح معنی‌دار بر زنده مانی سوروم نمایان کرده است. فاکتور وضعیت (CF) شاخص مفیدی در چرخه زیست‌شناسی و غذایی گونه‌ها بوده و راه دیگری برای بیان رابطه طول- وزن در یک ماهی معین است (Irianto و Austin، 2002). در تحقیق حاضر فاکتور وضعیت در سوروم تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد کم‌تر و این تفاوت معنی‌دار بود. نتایج مشابهی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* به‌دست آمد (Merrifield و همکاران، 2009).

یک میکروارگانیسم به‌منظور داشتن فعالیت مناسب و مطلوب باید با غلظت مناسب و کافی در جیره غذایی اضافه شود. برای جلوگیری از مصرف بیش از حد (صرف هزینه اضافی) و یا مصرف در سطح کم‌تر (بی اثر بودن) که منجر به اثر بخشی کم‌تر و هزینه‌های غیرضروری می‌گردد باید سطح پربیوتیک موثر تعیین شود که نیاز به تحقیقات میدانی فراوان می‌باشد. به‌طور عمده، تعیین این‌که آیا به‌طور واقعي پروبيوتيك‌ها تأثير مثبتي روي طعم غذا داشته و تغييري را در بهبود قابليت هضم غذا ايجاد مي‌نمايند نيز بسيار مهم مي‌باشد (Irianto و Austin، 2002) که می‌تواند از اهداف تحقیق در آینده باشد.

پارامترهای خونی: خون حساس‌ترین بافت بدن نسبت به تغییرات ایجاد شده در موجودات زنده بوده و در تحقيقات ماهي شناسي كاربرد وسيعي دارد (Alwan و همکاران، 2009). در این مطالعه آنالیز هماتولوژي ماهیان سوروم تغذیه شده با مکمل پروبیوتیك *Pediococcus acidilactici* نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوي 2 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره افزایش بیشتري در تعداد کل WBC داشتند که نسبت به گروه شاهد معني‌دار بود. به‌طور مشابه افزایش تعداد گلبول‌هاي سفید در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک *Micrococcus luteus* (Irianto و Austin، 2002)، در اسکار (*Astronotus ocellatus*) که با مکمل پروبیوتیکی پروتوکسین تغذیه شده بود (Firouzbakhsh و همکاران، 2011)، هم‌چنین در ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره غذایی حاوی *Pediococcus acidilactici* (Merrifield و همکاران، 2009)، در تیلاپیا تغذیه شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* (Ferguson و همکاران، 2010) مشاهده گردید. افزایش WBC احتمالاً به‌دلیل تحریک سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک می‌باشد چرا که گلبول‌های سفید از منابع اصلی تولید لیزوزیم (شاخص ایمنی) هستند (Merrifield و همکاران، 2009). می‌توان چنین بیان نمود که یک دوز مناسب از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک که وارد دستگاه گوارش ماهی می‌گردد به‌عنوان عوامل بیگانه مطرح می‌گردد، موجب تحریک سیستم دفاعی و افزایش تعداد گلبول‌های سفید و دیگر ترکیبات

ایمنی می‌گردد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011) که البته این مورد نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد. MCH، MCV و MCHC در تشخیص انواع کم‌خونی‌ها و متعاقب آن در تشخیص فقر آهن مفید هستند (Alwan و همکاران، 2009). در تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌داری در مقادیر حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در ماهیان سوروم تغذیه شده با جیره غذایی حاوی 2 گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که مشابه با تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی زینتی گرین ترور تغذیه شده با مکمل *P. acidilactici* (مدنی و همکاران، 1392)، ماهی اسکار تغذیه شده با مکمل پروتکسین (Firouzbakhsh و همکاران، 2011) و ماهی تیلاپیا *O. niloticus* تغذیه شده با *Pediococcus acidilactici* می‌باشد (Ferguson و همکاران، 2010). پایین بودن مقدار MCV می‌تواند به‌عنوان یک پارامتر خونی مثبت باشد زیرا با کوچک شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آن‌ها در رگ‌های خونی آسان‌تر و سریع‌تر می‌گردد و از ایجاد لخته جلوگیری می‌کند (Ferguson و همکاران، 2010). هم‌چنین میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین در این آزمایش در ماهیان تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک افزایش پیدا کردند که مشابه با نتایج به‌دست آمده برای روی ماهی اسکار تغذیه شده با مکمل پروتکسین می‌باشد (Firouzbakhsh و همکاران، 2011). با توجه به این‌که پروبیوتیک موجب افزایش متالوبیسم و در نتیجه افزایش نیاز به اکسیژن می‌گردد؛ از این‌رو افزایش تعداد RBC، موجب افزایش غلظت هموگلوبین و در نهایت منجر به افزایش ظرفیت حمل اکسیژن در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک می‌گردد. بنابراین، احتمالاً چنین ماهیانی در شرایطی که اکسیژن بسیار نیاز می‌باشد توانایی بیش‌تری برای تامین اکسیژن به بافت‌ها دارا می‌باشند (Firouzbakhsh و همکاران، 2011).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در سطوح مورد مطالعه، قابلیت تأثیرگذاری بالایی بر افزایش عملکرد رشد، تغذیه و بهبود پارامترهای خونی و به‌طورکلی افزایش سلامتی بچه‌ماهیان سوروم دارد و این پروبیوتیک می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی بچه‌ماهی سوروم باشد. ضمناً در نتیجه آزمایش مشخص شد که افزودن این پروبیوتیک به‌میزان 2 گرم در کیلوگرم جیره غذایی، اثر مناسبی در افزایش فاکتورهای وزنی و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارهای مورد مطالعه دارد.

منابع

1. **پورداود، م.؛ سجادی، م.م. و بحری، ا.ه.، ۱۳۸۹.** بررسی تاثیر جیره‌های غذایی حاوی مخمر *ساکارومایسیس سرویزیا* بر رشد، زنده مانی و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی ماهی سوروم (*Heros severus*). مجله علمی آبزیان و شیلات. سال 1، پیش شماره 1، صفحات 23 تا 31.
2. **مدنی، ن.؛ مورکی، ن.؛ انوار، ا.؛ منوچهری، ح. و قربانی، م.، 1392.** اثر کاربرد پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*). مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای. دوره 11، شماره 2، صفحات 1291 تا 1302.
3. **Abraham, T.J; Mondal, S. and Babu, C.H.S., 2008.** Effect of Commercial Aquaculture Probiotic and Fish Gut Antagonistic Bacterial Flora on the Growth and Disease Resistance of Ornamental Fishes *Carassius auratus* and *Xiphophorus helleri*. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol.25, No.1, pp: 27-30.
4. **Ajiboye, A. and Faturoti, E., 2011.** Growth performance of Synodontis nigrita raised on different dietary crude protein levels. International Journal of Aquatic Science. Vol.2, No. 1, pp: 27-35.
5. **Alwan, S.F.; Hadi, A.A. and Shokr, A.E., 2009.** Alterations in haematological parameter of fresh water fish. Tilapia Zilli exposed to Aluminium. Journal of Science and Its Applications. Vol.3, No.1, pp: 12-19.
6. **Anderson, A., 2013.** The effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* on the gut micribiota ecology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykissWalbaum*). Journal the Plymouth Student Scientist. Vol.6, No.1, pp: 86-103.
7. **Avella, M.A.; Olivotto, I.; Silvi, S.; Place, A.R. and Carnevali, O., 2010.** Effect of dietary probiotics on

clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. Am Journal Physiol Regul Integr Comp Physiol. Vol. 289, pp: 359-371.

8. **Blaxhall, P.C., 1972.** The haematological assessment of the health of freshwater fish. Journal Fish Biol. Vol. 4, pp: 593-604.
9. **Castex, M.; Lemaire, P.; Wabete, N. and Chim, L., 2009.** Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture. Vol. 294, No. 3-4, pp: 306-313
10. **Falahatkar, B.; Soltani, M.; Abtahi, B.; Kalbassi, M.R.; Pourkazemi, M. and Yasemi, M., 2006.** Effect of vitamin C on some growth parameters, survival and hepatosomatic index in juvenile cultured beluga (*Huso huso*). Journal Pajouhesh va-Sazandegi. Vol.72, pp: 98-103.
11. **Ferguson, R.M.W.; Merrifield, D.L.; Harper, G.M.; Rawling, M.D.; Mustafa, S.; Picchietti, S.; Balca´ zar, J.L. and Davies, S.J., 2010.** The effect of Pediococcus acidilactici on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Microbiology. Vol. 109, pp: 851-862.
12. **Firouzbakhsh, F.; Noori, F.; Khalesi, M. K. and Jani Khalili, K., 2011.** Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Journal Fish Physiol Biochem. Vol. 37, pp: 833-842.
13. **Gatesoupe, F.J., 2002.** Probiotic and formaldehyde treatments of artemia nauplii as food for larval pollack, Pollachius pollachius. Journal Aquaculture. Vol. 212, pp: 347-360.
14. **Ghosh, S.; Sinha, A. and Sahu, C., 2008.** Dietary probiotic supplementation in growth and health of live bearing ornamental fishes. Journal Aquac Nutr. Vol.14, pp: 289-299.
15. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Use of probiotics ro control furunculosis in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. Vol. 25, No. 1-10, pp: 333-342.
16. **Javaher, A. and Suman, B., 2008.** Effects of commerical aquaculture probiotic and fish gut antagonistic bacterial flora on the growth and disease resistance of ornamental fishes *Carassius auratus* and *Xiphophorus helleri*. Journal Aquatic science. pp: 45-68.
17. **Johnson, T.C.; Scholz, C.A.; Talbot, M.R.; Kelts, K.; Ricketts, R.D.; Ngobi, G.; Beuning, K.; Ssemmanda, I. and McGill, J.W., 1996.** Late pleistocene desiccation of Lake Victoria and rapid evolution of Cichlid fishes. Science. Vol. 273, pp: 1091-1093.
18. **Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Harper, G.M.; Baker, R.T.M.; Munn, C.B. and Davies, S.J., 2009.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal Aquaculture Nutrition. Vol.17, pp: 73-79.
19. **Williams, S., 1990.** Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC) 15th edn, Virginia. 1298 p.
20. **Yanbo, W. and Zirong, X., 2006.** Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Journal Animal Feed Science and Technology. Vol. 127, pp: 283-292.