تاثیر نانو ذره آهن و *Lactobacillus plantarum* KC426951 پوشش‌دار شده به صورت مجزا و تلفیقی بر فاکتورهای رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)*

حمیده کردی[۱]، علیرضا ولی پور[۱]*، محمود حافظیه[۲]، علیرضا شناور ماسوله[۳]

[۱]پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی ، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی ، ایران

[۲] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

[۳] موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

چکیده :

در این تحقیق تأثیر نانو ذره آهن و لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده به صورت مجزا و تلفیقی بر فاکتورهای رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بررسی گردید. برای این منظور ماهی‌ها پس از زیست سنجی با میانگین وزن ۰/۳۵± ۱۲/۹۴ گرم به صورت تصادفی در ۳۶ تانک ۵۰۰ لیتری (۳۰ عدد در هر تانک) ریخته شدند و با رژیم‌های غذایی مختلف، به مدت هشت هفته تغذیه گردیدند. در این تحقیق ۳ دوز (۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نانو ذره آهن و دو دوز باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دارشده (cfu/g ۱۰^۸ و ۱۰^۷) به صورت مجزا (۵ تیمار) و تلفیقی (۶ تیمار) در غذا و تیمار شاهد نیز بدون نانو ذره آهن و باکتری در نظر گرفته شد که در مجموع ۱۲ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) را شامل می‌شد. نتایج نشان دادند که بیش‌ترین مقدار افزایش وزن بدن، در تیمارهای حاوی ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن (T_4)، cfu/g 10^7 باکتری (T_1) و تیمار حاوی تلفیق این دو (T_8) و کمترین میزان آن در تیمارهای حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن و تلفیق آن با cfu/g 10^7- 10^8 باکتری (T_6 و T_7) بدست آمد ($P<0.05$). کمترین میزان ضریب تبدیل غذا و بیشترین ضریب رشد ویژه نیز در تیمار T_1 مشاهده گردید. همچنین کمترین درصد زنده‌مانی نیز به ترتیب در تیمارهای T6 و T7 دیده شد ($P<0.05$). بنابراین افزودن مقدار ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن و cfu/g ۱۰^۷ لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دارشده در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان توصیه می شود.

کلمات کلیدی: زنده‌مانی، رشد، قزل آلای رنگین‌کمان، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، نانو ذره آهن

*نویسنده مسئول : valipour40@gmail.com

مقدمه

نانو فناوری درک و کنترل ماده در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که در آن پدیده‌های منحصربه‌فرد، کاربردهای جدید و شگرفی را ممکن می‌سازند. البته، چنانچه پدیده‌های جدید و شگرف توسط ساختاری در ۲۰۰ نانومتر مشاهده شود، این نانوفناوری است که ماده را توانمند ساخته است و بنابراین محدوده‌ی مطالعه در نانو فناوری به شمار می‌رود (راشدی و همکاران، ۱۳۸۹). امروزه نانوتکنولوژی راه‌هایی را میسر کرده که برای افزایش بازده در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند. آهن یک عنصر ضروری است که برای بسیاری از فرایندهای متابولیکی نظیر حمل اکسیژن، متابولیسم داروها، سنتز استروئیدها، سنتز DNA، تولید ATPو نقل و انتقال الکترون‌ها نیاز است (Crichton, 1991). آهن درگیر در سازوکارهای کنترل کننده تشکیل خون و تنفس است و همچنین دارای اثرات تنظیم کننده کلیدی همسو با سنتز هورمون و متابولیسم اسید چرب است (Brody, 1994). با توجه به اینکه نیاز به یک سطح بهینه آهن در حفظ سلامتی ماهی به طور گسترده ثابت شده است، اما تا کنون چندین گزارش نتایج متضاد را برای میزان آهن مورد نیاز در ماهی‌ها، که از گونه به گونه‌ای دیگر و در شرایط محیطی متنوع متفاوت است، نشان داده است (Hem, 1989) و همچنین هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر مکمل نانو ذرات آهن بر رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین کمان وجود ندارد. دانشمندان آکادمی علوم روسیه گزارش دادند که ماهی کپور جوان و ماهیان خاویاری زمانی که با نانوذرات آهن تغذیه شده بودند به ترتیب ۳۰٪ و ۲۴٪ رشد بیشتری نشان دادند (ETC, 2003).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که باعث افزایش رشد و حفظ جاندار در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند و به صورت غذای کمکی به‌کاربرده شده و آثار مفیدی در تعادل میکروبی روده دارند (Ruiz et al., 1997). پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند به عنوان میکروب، به منظور بهبود ارزش غذایی خوراک دام در نظر گرفته شوند. اکثر پروبیوتیک‌های مورد استفاده در تغذیه حیوانات، باکتری های اسید لاکتیک هستند. *Lactobacillus plantarum* یکی از گونه هایی است که به طور معمول به عنوان پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود. معمولا پروبیوتیک‌ها می‌توانند اشتها را تحریک کنند و ارزش تغذیه‌ای غذا را با با تولید ویتامین‌ها، سم زدایی از ترکیبات در رژیم غذایی و تجزیه اجزای غیر قابل هضم افزایش دهند (Irianto and Austin, 2002). بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند پارامترهای رشد و ایمنی در آبزیان را بهبود بخشد. اشنوخواه و همکاران (۱۳۹۲) تاثیر اشکال مختلف *Lactobacillus casei* را بر رشد و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان بررسی کردند، نتایج این تحقیق نشان داد افزودن این باکتری به جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان باعث بهبود رشد و تقویت ایمنی این ماهی می‌گردد. قلجایی فرد و همکاران در سال ۹۳ نیز بیان نمودند باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951 جداسازی شده از روده قزل آلای رنگین کمان می‌تواند به عنوان یک فاکتور مثبت جهت بهبود فلور باکتریایی روده، عملکرد رشد و ترکیب لاشه مورد استفاده قرار گیرد. فعالیت و زنده ماندن باکتری‌های پروبیوتیک به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات سلامتی بخش است. مانع اصلی برای حفظ این باکتری‌ها در سطح مطلوب، وابستگی گونه ارگانیسم‌های پروبیوتیکی و قابلیت زنده‌مانی ناچیز ناشی از تنش اسیدیته و اکسیژن و نقصان مواد غذایی می‌باشد (Talwalkar and Kailasapathy, 2004; Shah, 2000). علاوه براین pH بسیار پایین معده، همچنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های انتقال یافته است. از این‌رو بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است (Jayalalitha *et al.*, 2012). جهت غلبه بر این مشکلات، شیوه‌های مختلفی شامل کشت‌های میکروبی انتخابی، ریزپوشانی و افزودن پری بیوتیک‌ها وجود دارد (Capela *et al.*, 2006). از عمده‌ترین ترکیبات مورداستفاده در ریزپوشانی پروبیوتیک ها، صمغ آلژینات

سدیم است. این صمغ یک هترو پلی ساکارید خطی متشکل از دیمانورونیک اسید و ال گلورونیک اسید می‌باشد که در دیواره سلولی و فضاهای بین سلولی جلبک قهوه‌ای یافت می‌شود. علت استفاده از آلژینات برای ریزپوشانی باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل طبیعت بی‌خطر، سهولت استفاده و قیمت پایین آن می‌باشد. آلژینات به هنگام ایجاد ژل دارای منافذی است که به خوبی می‌تواند باکتری‌ها را که در اندازه میکرون هستند در خود به دام اندازد (Mokarram *et al*., 2009).

از آنجا که تهیه جیره غذایی و تغذیه پرهزینه‌ترین بخش تولید می‌باشد، لذا توجه به تهیه جیره و افزایش راندمان غذا جهت بهینه سازی اقتصاد آبزی‌پروری، مهمترین بخش پرورش می‌باشد. امروزه علاوه بر تلاش برای تهیه جیره‌هایی با بالاترین کیفیت و بهترین ضریب تبدیل غذایی (با استفاده از بهترین فرمولاسیون‌های غذایی و استفاده از ترکیباتی مانند جاذب‌های غذایی، مواد معدنی، پروبیوتیک‌ها، پریبیوتیک‌ها، اسیدهای آمینه و . . .)، سعی بر تولید خوراک‌هایی می‌شود که بتواند توان ماهی در برابر انواع استرس‌ها و پاتوژن‌ها را نیز ارتقاء دهد. انکپسولیشن یا ریزپوشانی نیز تکنیکی جدید برای حفظ بهتر این ترکیبات و افزایش دسترسی زیستی آن‌ها می‌باشد. بنابراین در این تحقیق تأثیر نانو ذره آهن و باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951 پوشش-دار شده به صورت مجزا و تلفیقی بر عامل‌های رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

این تحقیق در شرکت ریز جلبکی پارسیان واقع در شهرک نیمه‌صنعتی پارک علم و فناوری فشتام، استان گیلان انجام گردید. ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از بخش خصوصی (مزرعه آقای شاهرودی) در استان گیلان خریداری شد.

تهیه باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951

در این تحقیق از باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951، استخراج شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توسط شرکت دانش بنیان زیست یار وارنا استفاده گردید. این باکتری با کد KC426951 در سال ۲۰۱۳ در بانک ژن (NCBI)ثبت شده است.

تهیه نانو ذرات آهن

در این تحقیق از نانو ذرات آهن (Fe_3O_4) در اندازه ۱۰-۸ نانومتر استفاده شد. این ماده از شرکت Nano Green Chem Co. واقع در پارک علم و فناوری گیلان (رشت-ایران) خریداری گردید.

پوشش‌دار کردن باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951

پوشش‌دار کردن باکتری *Lactobacillus plantarum* با استفاده از آلژینات سدیم به روش ژلاتینه کردن خارجی (Sheu and (Marshall, 1993 صورت گرفت. برای این منظور ابتدا آلژینات سدیم در آب دیونیزه حل شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت. سپس یک قسمت باکتری (10^{12} cfu/g) با چهار قسمت آلژینات سدیم مخلوط گردیده و بر روی همزن مغناطیسی با دور ۳۰۰ rpm قرار گرفت و مخلوط (۹۹ گرم روغن حیوانی بعلاوه ۱ گرم توبین ۸۰) به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه یک امولسیون یکنواخت و کدر در ظرف ایجاد گردید. سپس ۴۰ میلی لیتر از یک امولسیون حاوی کلسیم (۶۰ گرم روغن گیاهی بعلاوه ۰/۵ گرم توبین ۸۰ بعلاوه ۳۹/۵ گرم کلسیم کلراید ۰/۱ مولار) در بورت به آرامی به آن (روی همزن مغناطیسی (۱۰۰rpm) اضافه گردید. در اثر تماس آلژینات با کلسیم دیواره کپسول شکل گرفت و دانک‌ها (دانه‌های کوچک) به شکل ذرات ریز ته نشین شدند. سپس دانک‌ها بوسیله سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جداسازی شده و با آب استریل شست و

شو و در نهایت بوسیله فریز درایر به مدت نیم ساعت خشک گردید.

شمارش باکتری‌ها بعد از پوشش‌دار کردن

برای بررسی بازده فرایند میکروانکپسوله کردن، میکروکپسول‌های معلق در پپتون واتر (PS) بوسیله کاغذهای صافی استریل شده جداسازی شدند. مقدار یک گرم از میکروکپسول‌ها در ۹۹ میلی لیتر سدیم سیترات استریل ۱ درصد (pH حدود ۶ تنظیم شده بود) ریخته شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت. در طی این فرایند دیواره دانک‌های آلژینات تخریب شده و باکتری‌ها رها شدند. پس از این مرحله عمل رقیق سازی و سپس کشت در محیط MRS آگار صورت گرفت. کشت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس تعداد باکتری‌ها با سه تکرار شمارش گردید (Mokarram *et al*., 2009).

ترکیب جیره غذایی

جهت تغذیه بچه ماهیان از جیره دست‌ساز که مشخصات آن در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است، استفاده گردید. در این آزمایش از جیره‌های ایزوکالریک و ایزونیتروژنوس استفاده شد. برای تهیه جیره‌های آزمایشی مواد اولیه خشک آسیاب شده با یکدیگر مخلوط شده، سپس روغن و آب به آن‌ها اضافه گردید. با توجه به جدول ۲ مخلوط معدنی به صورت مجزا و بدون آهن ساخته شد سپس با توجه به تیمارهای آزمایشی، ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم پودر FeSO4.7H2O، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن Fe_3O_4 به آن اضافه گردید و به جیره پایه افزوده شد. مخلوط خمیری از چرخ گوشت عبور داده شده و پس از آن، رشته‌ها در داخل آون با دمای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ ساعت خشک شده و سپس به صورت پلیت درآمدند.

جدول ۱: ترکیب جیره پایه بدون مخلوط معدنی

ردیف	ترکیبات	میزان در جیره ٪
۱	ژلاتین	۲/۵
۲	نشاسته	۹
۳	آرد گندم	۷/۸۴
۴	آرد ذرت	۳
۵	پودر ماهی	۴۸
۶	پودر سویا	۱۲/۲۹
۷	سلولز	۲/۴۷۷۸
۸	روغن ماهی	۹/۸۵
۹	C ویتامین	۰/۰۲
۱۰	کولین کلراید	۰/۵
۱۱	متیونین	۱/۵
۱۲	لیزین	۱/۵
۱۳	مخلوط ویتامینی	۱/۵
۱۴	مخلوط معدنی	۰/۰۲۲

جدول ۲: ترکیبات مخلوط معدنی بدون آهن در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان

ردیف	ترکیبات	میزان میلی گرم / کیلوگرم
۱	سولفات منگنز	۵۰
۲	سولفات مس	۶
۳	یدید پتاسیم	۶
۴	سولفات روی	۱۰۰

جدول ۳: آنالیز تقریبی جیره های آزمایشی

ردیف	ترکیبات مغذی	میزان در جیره (٪)
۱	پروتئین خام	۴۵
۲	چربی خام	۱۴
۳	رطوبت	۷/۵
۴	خاکستر	۵
۵	کربوهیدرات	۲۴
۶	فیبر	۱/۵
۷	انرژی خام (kcal/kg)	۴۷۱۰

جیره‌های آزمایشی

جیره های آزمایشی از ۹ تیمار تشکیل شدند (جدول ۴). جهت آماده سازی تیمارهای دارای تلفیق باکتری پوشش‌دار و نانو ذرات آهن بعد از پوشش‌دار کردن باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم KC426951، باکتری‌ها در ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی (برای هر یک کیلوگرم غذا) معلق شده و سپس رو کل غذا (به ترتیب جیره پایه و جیره های حاوی نانوذرات آهن) به طور کامل اسپری شدند. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در آون خشک گردیدند.

جدول ۴: تیمارهای آزمایشی بر اساس مقادیر مختلف نانو ذره آهن و باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دار تغذیه شده توسط بچه ماهیان قزل آلا در دوره آزمایش

تیمار آزمایشی	حاوی نانو ذره آهن (میلی گرم بر کیلوگرم)	حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش دار (cfu/g)
۰	-	-
۱	-	$۱۰^{۷}$
۲	-	$۱۰^{۸}$
۳	۳۰	-
۴	۶۰	-
۵	۹۰	-
۶	۳۰	$۱۰^{۷}$
۷	۳۰	$۱۰^{۸}$
۸	۶۰	$۱۰^{۷}$
۹	۶۰	$۱۰^{۸}$
۱۰	۹۰	$۱۰^{۷}$
۱۱	۹۰	$۱۰^{۸}$

شرایط انجام آزمایش

قبل از شروع آزمایش بچه ماهی‌ها به مدت ۲۱ روز در محیط آزمایش نگهداری و با محیط سازش یافتند. سپس ماهی‌ها پس از زیست سنجی با میانگین وزن ۱۲/۹۴ ±۰/۳۵ گرم(میانگین± انحراف معیار) به صورت تصادفی در ۳۶ تانک ۵۰۰ لیتری (۳۰ عدد در هر تانک) رهاسازی شدند و با رژیم‌های غذایی مختلف، ۱۲ تیمار مختلف، به مدت هشت هفته تغذیه گردیدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. ماهی‌ها دوبار در روز به میزان ۵ درصد وزن بدن در ماه اول و ۳ درصد وزن بدن در ماه دوم تغذیه شدند. زیست سنجی برای بررسی وزن بدن هر ۱۴ روز یکبار صورت گرفت. تعویض آب به صورت روزانه انجام شد و کیفیت آب در طی مدت تحقیق به صورت روزانه بررسی گردید. پی اچ آب به طور میانگین ۷/۹۹±۰/۲ و دمای آب ۱۶/۷۱±۱/۳۵ درجه سانتیگراد بود.

بررسی شاخص‌های رشد و ماندگاری

برای بررسی رشد ماهیان و مقایسه بین تیمارها از شاخص‌های رشد شامل درصد زنده مانی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و میزان افزایش وزن بدن استفاده شد(Tacon, 1990).

$$PWG = ۱۰۰ \times \frac{(\text{وزن اولیه} - \text{وزن پایانی})}{\text{وزن اولیه}}$$ (درصد افزایش وزن بدن)

$$WG = \text{وزن پایانی} - \text{وزن اولیه}$$ (افزایش وزن بدن)

$$FCR = \frac{\text{مقدار غذای مصرف شده}}{\text{افزایش وزن بدن}}$$ (ضریب تبدیل غذا)

$$SGR = ۱۰۰ \times \frac{lnw2 - lnw1}{t}$$ (ضریب رشد ویژه)

w_2= وزن پایانی، w_1 = وزن اولیه ، t = طول دوره پرورش

درصد زنده مانی:

جهت بررسی اثر جیره‌های غذایی بر بازماندگی بچه ماهیان قزل آلا، تعداد تلفات در کل دروه پرورش جمع آوری و ثبت شده و در انتها از فرمول ذیل میزان زنده‌مانی ماهیان برای هر تیمار محاسبه گردید:

= درصد زنده مانی

۱۰۰ × تعداد ماهی در انتهای آزمایش/ تعداد ماهی در ابتدای آزمایش

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح کلی این تحقیق طرح کاملا تصادفی بود. جهت بررسی داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه نرم افزاری ۱۸SPSS مورد ارزیابی قرارگرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ مشخص شد.

نتایج

با توجه جدول شماره ۵ بیشترین افزایش وزن (WG) و درصد افزایش وزن بدن (PWG)، در تیمارهای T_1، T_4 و T_8 مشاهده گردید که به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود ($P<0.05$). کمترین افزایش وزن و درصد افزایش وزن بدن نسبت به سایر تیمارها نیز در تیمارهای T_3، T_6 و T_7 مشاهده گردید ($P<0.05$). کمترین میزان ضریب تبدیل غذا (FCR) در تیمارهای T_1 و T_8 مشاهده شد که این اختلاف نسبت به تیمار شاهد معنی دار نبود ($P>0.05$). اما در تیمار T_6 میزان ضریب تبدیل غذا به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). همچنین ضریب رشد ویژه (SGR) در تیمارهای T_1 و T_4 به طور معنی داری بیشتر از شاهد و در تیمارهای T_6 و T_7 کمتر از سایر تیمارها مشاهده گردید ($P<0.05$). درصد زنده مانی نیز تنها در تیمارهای T_6 و T_7 کمتر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$) و در بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0.05$).

جدول ۵: تاثیر باکتری *Lactobacillus plantarum* KC426951 پوشش‌دار شده و نانو ذرات آهن بر فاکتورهای رشد و زنده مانی ماهی قزل آلای رنگین کمان به صورت مجزا و تلفیقی

عوامل رشد	T_0	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7	T_8	T_9	T_{10}	T_{11}
WG	38.97± 3.92^{b}	47.08± 0.39^{a}	41.58± 1.09^{ab}	32.74 ±1.19^{c}	47.08± 3.20^{a}	40.93 ±2.70^{ab}	27.69± 9.13^{c}	28.17± 3.8^{c}	46.12± 3.99^{a}	41.68± 1.11^{ab}	43.74± 0.58^{ab}	42.26± 0.42^{ab}
PWG	299.05 ±24.35^{b}	368.24 ±26.93^{a}	324.14 ±28.08^{ab}	253.11±4.85^{c}	367.36 ±40.49^{a}	317.72±6.89^{ab}	212.49 ±59.46^{c}	217.58 ±23.04^{c}	355.49 ±19.07^{a}	321.55 ±5.37^{ab}	339.06 ±7.69^{ab}	324.42 ±8.74^{ab}
FCR	0.96±0 .09^{abc}	0.78±0 .02^{a}	0.92±0. 01^{abc}	1.01± 0.02^{bc}	0.83±0 .06^{ab}	0.88± 0.02^{ab}	1.28±0 .31^{d}	1.10±0 .11^{c}	0.80±0 .05^{a}	0.84±0 .00^{ab}	0.85±0 .03^{ab}	0.85±0 .01^{ab}
SGR	3.07±0 .14^{bc}	3.43±0 .13^{a}	3.21±0. 15^{ab}	2.80 ± 0.03^{cd}	3.42±0 .19^{a}	3.18± 0.04^{ab}	2.49 ± 0.43^{e}	2.56±0 .16^{ed}	3.36±0 .09^{ab}	3.20±0 .03^{ab}	3.29±0 .04^{ab}	3.21±0 .05^{ab}
درصد بازماندگی	100.00 ±00^{a}	100.00 ±0.00^{a}	100.00 ±0.00^{a}	98.89 ±1.92^{a}	98.89± 1.92^{a}	100.0 0±00^{a}	72.22± 5.56^{c}	83.33± 5.56^{b}	100.00 ±0.00^{a}	100.00 ±0.00^{a}	100.00 ±0.00^{a}	100.00 ±0.00^{a}

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار در هر ردیف می‌باشد ($P<0.05$).

بحث

ماهی قزل آلا رنگین کمان(*O. mykiss*)، یکی از محبوب ترین و مقرون به صرفه ترین ماهیان در ایران می‌باشد بنابراین در این تحقیق تلاش گردید اثر نانو ذره آهن و *Lactobacillus plantarum* KC426951پوشش‌دار شده به صورت مجزا و تلفیقی بر فاکتورهای رشد و زنده مانی این ماهی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق بهترین افزایش وزن و درصد افزایش وزن بدن، در تیمار حاوی 60 میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن، تیمار حاوی 10^7 cfu/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده و تیمار حاوی تلفیق این دو مشاهده گردید که به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود ($P<0.05$). کمترین افزایش وزن و درصد افزایش وزن بدن نسبت به سایر تیمارها نیز در تیمارهای حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن و تیمارهای حاوی تلفیق آن با 10^7 -10^8 cfu/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده مشاهده شد ($P<0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذا (FCR) در تیمارهای حاوی 10^7 cfu/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده و همچنین تیمار تلفیق آن با 60 میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن مشاهده شد که این اختلاف نسبت به تیمار شاهد معنی دار نبود ($P>0.05$) همچنین ضریب رشد ویژه در تیمارهای حاوی 10^7 cfu/g باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم پوشش‌دار شده و همچنین تیمار حاوی ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن طور معنی داری بیشتر از شاهد بود ($P<0.05$). در تیمار حاوی تلفیق ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن و 10^7 cfu/g باکتری میزان ضریب تبدیل غذا به طور معنی‌داری ضعیف‌تر از سایر تیمار بود ($P<0.05$). همچنین در تیمارهای حاوی تلفیق ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن و 10^7 -10^8 cfu/g باکتری ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی کمتر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). در تمامی پارامترهای رشد و زنده مانی بین تیمارهای حاوی ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$). Prochorov و همکاران (2002) بیان کردند میزان رشد

ماهی کپور و خاویاری که آهن را به شکل نـانو ذرات آهـن پراکنده همراه بـا خـوراک بـه میـزان ۰/۷ میلـی گـرم بـر کیلوگرم غـذا دریافـت کـرده بودنـد، بـه ترتیـب ۳۰ و ۲۴ درصـد افـزایش داشـت و همچنـین میـزان مـرگ و میـر ماهی‌ها به میزان قابل توجهی به ۸۰ درصد در مقایسـه بـا ماهی در گروه کنترل کاهش یافته بـود. Lim و همکـاران (2000) نشان دادند ماهی تغذیه شده با رژیم‌هـای بـدون مکمل آهن به طور قابل توجهی کاهش وزن، ضریب تبدیل غذایی ضعیف‌تر و کاهش ارزش‌هـای هماتولوژیـک (تعـداد کـل سـلول‌هـای خـونی، RBC، HTC و Hb) داشـتند. همانند تحقیقات قبلی روی گربه ماهی کانال کـه بوسـیله Gatlin and Wilson (۱۹۸۶)، Lim و همکـاران (۱۹۹۶) و Lim and Klesius (۱۹۹۷) انجام شـده بـود، کـاهش معنـی‌دار در میـزان زنـده مـانی توسـط Lim و همکاران(۲۰۰۰) نیز گزارش شد. بر خلاف نتـایج تحقیـق حاضر، Andersen و همکـاران (۱۹۹۸) هـیچ تـأثیری بـر رشد، ضریب شرایط یا مرگ و میر بچـه ماهیـان سـالمون آتلانتیک تغذیه شده با رژیم غذایی اکسترود شـده همـراه با، یا بدون افـزودن ۴۰۰ میلـی گـرم آهـن / کیلـوگرم بـه صورت سولفات آهن و ۱۵۰ میلی گـرم بـر کیلـوگرم از دو فرم شیمیایی مختلف اسید اسکوربیک (پلی فسفات اسـید اسکوربیک،AAPP یا اسـید اسـکوربیک بـا پوشـش اتیـل سلولز، AAEC) برای ۲۰ هفته، مشاهده نکردند. همچنین Bjørnevik and Maage (1993) و Andersen و همکاران (1996) نشان دادند که این پارامترها در مـاهی آزاد اقیانوس اطلس، تحت تاثیر سطح آهن قرار نگرفتند. همسـو بـا نتـایج ایـن تحقیـق M.K.abumourad و همکـاران (2013) نشـان دادنـد کـه در مـاهی‌هـای *O. niloticus* تغذیه شده با 10^7 cfu/g لاکتوباسیلوس عملکرد رشد، میزان زنده مانی و میزان راندمان پـروتئین افـزایش یافتـه بـود. همچنـین Rengpipat و همکـاران (1998) و Prabhu و همکـاران (1999) بیـان نمودنـد پروبیوتیک به طور معنی‌داری باعـث افـزایش نـرخ رشـد و زنده مانی میگوها نسبت به گروه کنترل شد کـه بـا نتـایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. مطالعـات پیشـین نشـان داده است باکتری‌های اسید لاکتیک اثـرات مثبتـی بـر میـزان رشد در کپور ماهیان جوان دارد، اما تاثیری بر مـاهی سـی بـاس نـدارد (Noh et al., 1994). Kennedy و همکاران (1998) نشان دادند که اضافه کردن یک باکتری پروبیوتیک گرم مثبت باعث بهبودی زنده مانی، یکنواختی اندازه و سرعت رشد لاروهای ماهی‌هـای دریـایی اسـنوک، شوریده قرمز، قزل آلای خالـدار و کفـال راه راه مـی‌شـود. Standen و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند افزودن مـداوم AquaStar® Growout (پروبیوتیک تجاری) به میـزان ۳ گرم در کیلوگرم غذا مـی‌توانـد عملکـرد رشـد را بهبـود بخشد و وضعیت ایمنی روده را در تیلاپیـا افـزایش دهـد. همچنین Uma و همکاران (1999) بهبود قابل ملاحظه و معنی‌داری در FCR ، FER و PER لارو هـای میگـو در هنگام تغذیه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم کپسـوله شـده بـه صـورت زیسـتی در آرتمیـا مشـاهده کردنـد. مشـاهدات مشـابهی توسـط Suralikar و Sahu (2001) در هنگـام تغذیه پست لاروهای *M. rosenbergii* با رژیم غـذایی حاوی پروبیوتیک *L. cremoris* به میزان 8.5×10^{11} $CFU.g^{-1}$ بدست آمد.

توصیه ترویجی

نتایج این تحقیق نشان داد که عملکرد رشد و زنده‌مانی در تیمارهایی که حاوی نانو ذرات آهن و باکتری بودند تحـت تأثیر قرار گرفته بطوریکـه در ماهیـان تغذیـه شـده بـا ۶۰ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم نـانو ذرات آهـن و $۱۰^{۷}$ بـاکتری پوشـش‌دار لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم بـه صـورت مجـزا و تلفیقی پارامترهای رشد و زنده‌مانی بهبود یافت. با توجه به اینکه افزودن این مواد هزینه بسیار ناچیزی به قیمـت غـذا اضافه می‌کند و با توجه به مزایای استفاده از آن، بنـابراین توصیه می شود که در جیره‌های غـذایی مـاهی قـزل آلای رنگین کمان از آن‌ها استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ گونه کمک و کوششی دریغ نورزیدند به ویژه شرکت ریزجلبک پارسیان و مدیر عامل محترم آن، آقای حمید دنیایی داریان به عنوان حامی مالی و تمامی کارکنان زحمتکش این مجموعه و همچنین پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور (بندر انزلی) تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

اشنوخواه، م.، توکمه چی، ا.، فرخی، ف. و منافقر، ر.، ۱۳۹۲. مقایسه‌ی تأثیر اشکال مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله دامپزشکی ایران، ۹:۲۵-۳۵.

راشدی، ح.، عمو عابدینی، ق. و اسکندری، س.، ۱۳۸۹. زیست فناوری نانو. تالیف: پاپازوگلو، الف. و پارتاساراسی، الف.، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۶۰ صفحه.

قلجایی فرد، ا.، خارا، ح. و شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۵. اثر باکتری *Lactobacillus plantarum* (KC426951) جداسازی شده از روده قزل آلای رنگین کمان استان گیلان بر فاکتورهای رشد، فلور باکتریایی روده و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و فنون شیلات، ۵: ۱۱۱-۱۲۴

Andersen, F., Lygren, B., Maage, A., Waagbø, R., 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar)* smolts. Aquaculture, 161: 437-451.

Andersen, F., Maage, A. and Julshamn, K., 1996. An estimation of dietary requirements of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Aquaculture Nutrition, 2: 41-47.

Bjørnevik, M., Maage, A., 1993. Effects of dietary iron supplementation on tissue iron concentration and haematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fisk Dir Skr Ser Ernaering, 6: 35–45.

Brody, T., 1994. Nutritional Biochemistry. Academic Press, San Diego, California, 658 p.

Capela, P., Hay, T. K. C. & Shan, N. P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freezedried yoghurt. Food Research International, 39: 203-211.

Crichton, R.R. 1991. Inorganic biochemistry of iron metabolism. West Sussex: Ellis Horwood Ltd. 355 p.

ETC (Action Group on Erosion, Technology and Concentration). 2003. Down on the Farm: The Impact of Nanoscale Technologies on Food and Agriculture. http://www.etcgroup.org/en/materials/publications.html?pub_id=80.

Gatlin, D.M. and Wilson, R.P., 1986. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture, 52: 191-198.

Hem, I.D., 1989. Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water, 3rd edn. US Geological Survey Water- Supply, Paper 2254, United States Government Printing Office, Washington, DC.

Ibrahim, F., Quwehand, A.C. and Salminen, S.J. 2004. Effect of temperature on *in vitro* adhesionof potential fish probiotics. Microbial Ecology in Health and Disease, 16: 222–227.

Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture (Review). Journal of Fish Diseases, 25: 633-642.

Jayalalitha, V., Balasundaram, B. and Palanidorai, R. 2012. In Vitro assessment of Microencapsulated Probiotic Beads. International Journal of Agriculture: Research and Review, 2: 1-6.

Kennedy, S.B., Tucker, J.W., Thoresen, M. and Sennett, D.G., 1998. Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae.

Agrochemical Services, 10th Foresight Conference on Molecular Nanotechnology.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1998. Effect of probiotics on Black Tiger shrimp, Penaeus monodon, survival and growth. Aquaculture, 167: 301-313.

Ruiz, P.C., Samain, J.F. and Nicolas, J.L. 1997. Antibacterial activity exhibited by marine strain Rose bacter sp. In: Le, G.Y. and Muller, F.A. (Eds).Marine micro organisms for industry, Proceedings of the meeting held in Breast (17-19 sep., 1997). Microorganism-Marins-Pour-LIndustrie-Actes- Du- Colloque- Tenu- A- Brest- Du- 17- Au- 19- September1997. Plouzane-France, Ifremer, 21: 166-168.

Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science, 83: 894-907.

Sheu, T.Y. and Marshall, R.T., 1993. Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels. Journal of food science, 54: 557-561.

Standen, B.T., Peggs, D.L., Rawling, M.D., Foey, A., Davies, S.J., Santos, G.A. and Merrifield, D.L., 2016. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fish and Shellfish Immunology, 49: 427-35.

Suralikar, V. and Sahu, N.P. 2001. Effect of feeding probiotic (*Lactobacillus cremoris*) on growth and survival of *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Journal of Applied Animal Research, 20: 117-124.

Tacon, A.G.J. 1990. Standard methods for the fingerlings channel catfish. Journal of the World nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Aquaculture Society, pp: 24. Washington DC, Argent Laboratories Press, 454 p.

Talwalkar, A. & Kailasapathy, K. 2004. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3: 117-124.

Aquaculture 98, World Aquaculture Society, Baton Rouge, 286 p.

Lim, C., Klesius, P.H., 1997. Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus)* fed iron deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture, 157: 83-93.

Lim, C., Sealey, W.M., Klesius, P.H., 1996. Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish *Ictalurus punctatus*. Journal of World Aquaculture Society, 27: 290-296.

Lim, Ch., Klesius, Ph.H., Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture, 185: 313-327.

M.K.abumourad, I., Abbas, T.W., Awaad, E.S., Authman, M.M.N., El- Shafei, K., Sharaf, O.M., Ibrahim, G.A., Sadek, Z.I. and S.El- Sayed, H. 2013. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. Journal of Applied Sciences Research, 9: 572-582.

Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Najafi, M.B.H. and Shahidi, F., 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International, 42: 1040-1045.

Noh, S.H., Han, K., Won, T.H. and Choi, Y.J. 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast cultureand probiotics on the growth performance of Israeli carp. Korean J. Anim. Sci., 36: 480–486.

Prabhu, S., Lobelle-Rich, P.A. and Levy, L.S., 1999. The FeLV-945 LTR confers a replicative advantage dependent on the presence of a tandem triplication. Virology, 263: 460-470.

Prochorov, A.M., Pavlov, G.V., Okpattah, A.C.G. and Kaetanovich, A.V., 2002. The effect of nano-disperse iron on the biological parameters of fish. The Central Research Scientific Institute of

Uma, A., Abraham, T.J., Jeyaseelan, M.J.P. and Sundararaj, V. 1999. Effect of probiotic feed supplement on performance and disease resistance of Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. Journal of Aquaculture in Tropics, 14: 159-164.

Effect of iron nanoparticles and encapsulated *Lactobacillus plantarum* KC426951, as separate and combined on growth and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

Kordi H.[1]; Valipour A.[1*]; Haphezieh M.[2]; Shenavar Masouleh A.[3]

[1]Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.
[2] Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
[3] International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

Abatract
In this study investigated effect of iron nanoparticles and encapsulated *Lactobacillus plantarum* KC426951 on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as separate and combined. After biometry, fish introduced to tanks (30 fish per 500 l tanks) randomly with initial weight of 12.94±0.35 g and fed with different diets for 8 weeks containing 3 dosages of Fe_3O_4 nanoparticles (30, 60 and 90 mg.kg food^{-1}) and two dosage of encapsulated *Lactobacillus plantarum* (10^7 and 10^8 cfu.g^{-1}) as separate (5 treatments) and combined (6 treatments) and control diet without any supplement. There were 12 treatments and had three replications for each other's (36 tanks). Results showed that the highest weight gain enhanced in 60 mg/kg iron nanoparticles (T4), 10^7 cfu/g *Lactobacillus plantarum* (T1) and their combined (T8) and the lowest in 30 mg/kg iron nanoparticles and their combined with *Lactobacillus plantarum* (T6 and T7) ($p<0.05$). The minimum FCR and maximum SGR was observed in T1 ($p<0.05$). Also survival rate in T6 and T7 were lowest respectively ($p<0.05$). In totally, it is recommended to use of 60 mg/kg iron nanoparticles and 10^7 cfu/g encapsulated *Lactobacillus plantarum* in rainbow trout diet.

Keywords: growth, iron nanoparticles, *Lactobacillus plantarum*, rainbow trout, survival

[*]Corresponding author: valipour40@gmail.com