



Original Research Paper

Evaluation of microencapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on growth indices and some blood factors of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

Mansour Veissi ^{*1}, Ebrahim Rajabzadeh Qatarami ¹, Mojtaba Alishahi ², Takavar Mohammadian ²

¹Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr, Iran

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

Key Words

Microencapsulation
Lactobacillus bulgaricus
Growth
Nile tilapia

Abstract

Introduction: Tilapia is one of the most important farmed fish in the world and has been suggested as a source of protein for developing countries. Micro encapsulation of probiotics using natural biodegradable polymers and their oral administration, not only protect probiotics from degradation in the gastrointestinal tract, but leads to increased bioavailability of immunogenic antigens due to controlled release of bacteria.

Materials & Methods: In the present study, *Lactobacillus bulgaricus* bacteria isolated from the gastrointestinal tract of native fish of Khuzestan province were used for micro coating with alginate / chitosan and oral administration for 60 days. During the study period, some growth and blood factors were measured. One hundred and sixty Nile tilapia (weighing 25±2 g) randomly divided in four groups in triplicates (40 pieces/treatment and 3 repetitions). Groups 1 and 2 were fed with food supplemented with encapsulated and non-capsulated probiotic respectively. Group 3 was fed with alginate/chitosan free probiotic and group 4 was fed with basal diet without supplementation. Experimental diet was administrated for 60 days and fish biometry and blood sampling were conducted on days zero, 30 and 60 of experiment.

Result: The results showed that most of the growth indices including: fish weight gain, feed conversion ratio, feed efficiency ratio, specific growth rate and protein efficiency in the group fed with microencapsulation bacteria were significantly improved compared to other groups ($p < 0.05$).

Conclusion: Blood factors were not affected by probiotic administration and probiotic microencapsulation. Alginate / chitosan microparticles (10^8 cfu/g food) caused a significant improvement in growth indices compared to probiotic treatment without micro coating. However, fish blood factors were not affected by probiotic administration and probiotic microencapsulation.

* Corresponding Author's email: mansour.veissi@gmail.com

Received: 23 May 2021; Reviewed: 2 July 2021; Revised: 6 September 2021; Accepted: 9 October 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.301472.2619](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.301472.2619)

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ریزپوشانی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بر شاخص‌های

رشد و برخی ریزسنجه‌های خونی ماهی تیلاپای نیل *Oreochromis niloticus*منصور ویسی^{۱*}، ابراهیم رجب‌زاده‌قلمی^۱، مجتبی علیشاهی^۲، تکاور محمدیان^۲^۱ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریای خرمشهر، خرمشهر، ایران^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: ماهی تیلاپیا یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در جهان است. ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و تجویز خوراکی آن‌ها منجر به افزایش دسترسی زیستی آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا به دلیل رهاسازی کنترل‌شده باکتری‌ها می‌گردد.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر از ریزپوشانی با ریز ذرات آلژینات/کیتوزان در باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس جداسازی شده از روده بزرگ دستگاه گوارش ماهیان بومی استان خوزستان استفاده گردید. ۱۶۰ عدد ماهی تیلاپای نیل 2 ± 2 گرم، به چهار تیمار (هر تیمار ۴۰ قطعه و در سه تکرار) تقسیم شد، تیمار اول و دوم به ترتیب با خوراک حاوی پروبیوتیک بدون ریزپوشانی و با ریزپوشانی تغذیه شدند، تیمار سوم با خوراک حاوی آلژینات/کیتوزان بدون پروبیوتیک و تیمار چهارم با خوراک پایه بدون افزودنی تغذیه شدند. این تحقیق مدت ۶۰ روز ادامه یافت و در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ تحقیق ضمن زیست‌سنجی ماهی‌ها، نمونه‌های خون از تیمارها تهیه گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که اکثر شاخص‌های رشد شامل: میزان افزایش وزن ماهیان، ضریب تبدیل غذایی، نسبت بازده غذایی، میزان رشد ویژه و کارایی پروتئین در گروه تغذیه‌شده با باکتری ریزپوشانی شده (تیمار B) به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بهبود یافته بود ($p < 0.05$) فاکتورهای خونی تحت تأثیر تجویز پروبیوتیک و ریزپوشانی پروبیوتیک قرار نگرفتند ($p > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها تجویز لاکتوباسیلوس بولگاریکوس خوراکی به‌تنهایی باعث بهبود شاخص‌های رشد ماهی تیلاپیا می‌شود، بلکه ریزپوشانی این پروبیوتیک (10^8 cfu/گرم) با ریز ذرات آلژینات/کیتوزان ارتقای معنی‌دار شاخص‌های رشد نسبت به تیمار پروبیوتیکی بدون ریزپوشانی را باعث شده است. هرچند فاکتورهای خونی ماهی تحت تأثیر تجویز پروبیوتیک و ریزپوشانی پروبیوتیک قرار نگرفت.

مقدمه

لاکتات و استات تخمیر کند. برخی اثرات محیطی این باکتری به دلیل تولید مواد ضد باکتریایی است که باعث افزایش پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا شده و دسترسی به مواد مغذی و کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم نیز به نوبه خود افزایش خواهند یافت (۸). اکثر پروبیوتیک‌ها به روش خوراکی و به همراه غذا در آبزیان تجویز می‌شوند، یکی از مشکلات این پروبیوتیک‌ها، از دست رفتن تعداد زیادی از آن‌ها در مسیر لوله گوارش به ویژه در شرایط اسیدی معده و شرایط آنزیمی و هضمی ابتدای روده است. بهبود ماندگاری پروبیوتیک‌ها در روده مستلزم استفاده از شیوه‌های نوین از جمله ریزپوشانی با ترکیبات هیدروکلوئیدی است (۶). ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها با استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی و تجویز خوراکی آن‌ها در ارتقای عملکرد سیستم ایمنی، فاکتورهای خونی و رشد در ماهیان مختلف با موفقیت همراه بوده است (۹). ریزپوشانی با این پلیمرها علاوه بر محافظت از پروبیوتیک‌ها در برابر تجزیه شدن در سیستم گوارشی، منجر به افزایش دسترسی زیستی آنتی ژن‌های ایمنی‌زا به دلیل پراکندگی ذره‌ای و رهاسازی کنترل شده باکتری‌ها می‌گردد (۱۰). از طرفی این مواد با تحریک ترشح سایتوکین‌های مرتبط با پاسخ ایمنی در بافت هدف، ارتقای سیستم ایمنی ماهی را به دنبال دارند (۱۱). آلژینات سدیم یک پلی ساکارید طبیعی است که از دیواره سلولی جلبک‌های قهوه‌ای استخراج می‌شود و به عنوان یک پلیمر غیرسمی و تجزیه پذیر زیستی با خاصیت چسبندگی به مخاطات برای استفاده در واکسن‌های خوراکی مناسب به نظر می‌رسد (۱۲). کیتوزان یک پلیمر زیستی کاتیونی است که از پوسته سخت پوستان (بیشتر میگو) استخراج می‌گردد و پس از سلولز، فراوان‌ترین پلی ساکارید طبیعی است. کیتوزان دارای خصوصیات منحصر به فردی از جمله غیرسمی بودن برای انسان و حیوانات، قابلیت زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و زیست چسبندگی و مقابله در شرایط اسیدی است. با پوشش دار کردن ترکیبات فعال با کیتوزان، حافظت مناسبی از آن‌ها در برابر شرایط نامناسب دستگاه گوارش ایجاد می‌شود (۱۳). با توجه به اهمیت جهانی ماهی تیلاپیا در آبزی پروری و شرایط در حال توسعه پرورش این گونه در کشور و جایگاه باکتری پروبیوتیک بومی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، تأثیر ریزپوشانی این باکتری با ریز ذرات آلژینات/ کیتوزان بر شاخص‌های رشد و ریزسنگه‌های خونی ماهی تیلاپیا در این تحقیق ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری: باکتری مورد استفاده در مطالعه حاضر لاکتوباسیلوس بولگاریکوس جداسازی شده از روده بزرگ دستگاه گوارش

ماهی تیلاپیا یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در جهان است که بیش‌ترین رشد در میزان پرورش در دهه اخیر را در بین ماهیان استخوانی داشته است و به عنوان یک منبع پروتئین ارزان قیمت برای کشورهای در حال توسعه پیشنهاد شده است (۱). با توجه به مزیت‌های پرورشی این گونه و مشکلات زیست محیطی معرفی گونه به منابع آبی کشور، در سال‌های اخیر پرورش این ماهی نیز محل مناقشه بوده است و علی‌رغم مزیت‌های پرورشی مناسب این گونه مثل رشد خوب، تراکم پذیری بالا، تحمل کیفیت غذایی پایین، مقاومت بالا به استرس‌های محیطی مثل دمای بالا، کمبود اکسیژن، مسمومیت با ترکیبات ازته، تکثیر ساده و سریع به دلیل برخی مشکلات و معضلات زیست محیطی نگرش یکسانی به پرورش این گونه در کشور وجود نداشته است (۲). منتقدین معرفی و پرورش این گونه بیش‌تر بر مشکلات زیست محیطی این گونه در منابع آبی کشور تأکید داشته و آن را باعث نگرانی شدید می‌دانند (۳). در آخرین دستورالعمل‌ها مورد توافق متولیان آبزی پروری و محیط زیست کشور، پرورش در برخی استان‌های فاقد دسترسی به منابع آبی مجاز شناخته شده و پرورش این گونه در این استان‌ها در حال توسعه است، هم‌چنین متولیان آبزی پروری کشور نیز با اختصاص یک مرکز تحقیقاتی در بافق یزد، ضمن انجام تحقیقات کاربردی روی این گونه، امکان تولید بچه‌ماهی و مولد داخلی سالم را امکان پذیر ساخته‌اند (۴). پروبیوتیک‌ها به عنوان ارگانیسم‌های کوچک زنده‌ای شناخته می‌شوند که می‌توانند به صورت مکمل غذای زنده منجر به بهبود عملکرد دستگاه گوارش میزبان شوند. اخیراً استفاده از پروبیوتیک در صنعت آبزی پروری به صورت پیوسته در حال گسترش است (۵). پروبیوتیک‌ها در آبزیان محدود به بخش روده جانوران آبزی نشده بلکه به سیستم پرورشی و جمعیت باکتریایی موجود در محیط آبزی هم مرتبط است. لذا پروبیوتیک در آبزی پروری مجموعه‌ای از سلول‌های باکتریایی زنده، مرده و یا اجزای سلول بوده که از طریق غذا یا آب پیرامون محیط پرورشی منجر به پیشگیری از وقوع بیماری، ارتقای سیستم ایمنی و رشد، بهبود هضم غذا و تعادل سازی میکروب‌های محیطی و میزبانی، در نتیجه کاهش استرس در آبزی می‌شود (۶). انواع مختلفی از پروبیوتیک‌ها شامل لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی و استرپتوکوکوس لاکتیس از آبزیان جداسازی و مورد استفاده قرار گرفته است (۷). لاکتوباسیلوس یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی، بدون اسپور و میله‌ای شکل است. این باکتری از گونه‌های رایج ساکن در دستگاه گوارش مهره‌داران مختلف از جمله ماهیان استخوانی است که می‌تواند کربوهیدرات‌های مختلفی را عمدتاً به

مقایسه قرار گرفت. به این منظور تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی حدود 25 ± 2 گرم به ۴ گروه در سه تکرار تقسیم و به شرح زیر نگهداری شدند. نحوه چیدن مخازن به صورت بلوک های تصادفی بود.



شکل ۱: روش ژلاسیون یونی به منظور کپسوله کردن لاکتوباسیلوس بولگاریکوس

جدول ۱: تیمار بندی ماهیان

نام تیمار	نوع غذا	تعداد ماهی
A	جیره همراه با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
B	جیره همراه با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی نشده	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
C	جیره همراه با آلژینات / کیتوزان بدون حضور باکتری	۴۰ قطعه (در سه تکرار)
D	جیره بدون باکتری	۴۰ قطعه (در سه تکرار)

تغذیه ماهیان براساس توده وزنی و ۳ درصد وزن ماهی ها و اندازه گیری درجه حرارت آب، سه بار در روز و به مدت ۶۰ روز انجام گرفت. به منظور آماده سازی باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و افزودن آن ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۱۶) و Vine و همکاران (۱۷) استفاده شد. باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در محیط مایع MRS در شرایط بی هوازی کشت و پس از رشد، باکتری ها با سانتریفیوژ جداسازی و شستشو داده شده و به کمک لوله های استاندارد مک فارلند ۸ تنظیم گردیدند. بعد از کپسوله کردن باکتری ها به روش ذکر شده، از این باکتری ها برای ایجاد غلظت 10^8 باکتری در گرم خوراک ماهی ها استفاده شد. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری گردید.

ماهیان بومی استان خوزستان بود که از بین بیش از ۳۰ گونه دارای توان پروبیوتیکی انتخاب و به روش مولکولی و با استفاده پرایمرهای 16S RNA ریبوزومی تأیید گردید (۹).

کشت و جداسازی باکتری پروبیوتیکی: باکتری لاکتوباسیلوس

بولگاریکوس بعد از خروج از شرایط لیوفلیزه، در محیط کشت MRS جامد کشت داده شد، سپس محیط ها در دمای ۳۷ درجه در شرایط جار بی هوازی قرار گرفته و بعد از ۷۲ ساعت کلنی تک باکتری به محیط مایع MRSB تلقیح گردید. بعد از ۷۲ ساعت انکوباتور گذاری در ۳۷ درجه باکتری کشت داده شده شستشو و باکتری با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه از محیط جداسازی و تراکمی از باکتری با نسبت ۲/۴ میلیارد باکتری در میلی لیتر بافر PBS تهیه گردید.

کپسوله کردن باکتری به روش آیونیک با آلژینات / کیتوزان:

برای کپسوله کردن لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از روش ژلاسیون یونی استفاده شد (شکل ۱). در این روش ۱۱۷/۵ میلی لیتر محلول آلژینات- سدیم ۰/۰۶۳ درصد را که اسیدیته آن روی ۴/۹ تنظیم گردید با سوسپانسیون باکتریایی با تعداد ۲/۴ میلیارد در میلی لیتر مخلوط نموده و با دور ۸۰۰ دور در دقیقه مخلوط می گردد. به دنبال تهیه مخلوط حاصل، ۷/۵ میلی لیتر از محلول کلرید کلسیم ۱۸ میلی مولار را قطره قطره در مدت ۶۰ دقیقه به آن اضافه کرده تا یک پیش ژل آلژینات تهیه گردید. سپس ۲۵ میلی لیتر از محلول کیتوزان ۰/۰۷ درصد که اسیدیته آن روی ۴/۶ تنظیم گردید، به صورت قطره قطره به پیش ژل در مدت ۹۰ دقیقه اضافه شد. بعد از مرحله اضافه نمودن کیتوزان، به محصول به مدت ۳۰ دقیقه دیگر اجازه داده شده تا کپسولاسیون کامل شد. کپسول ها با سانتریفیوژ ۵ هزار دور در دقیقه به مدت یک ساعت جداسازی شدند (۱۴).

تعیین مشخصات کپسول های پروبیوتیکی: برای اطمینان

از تشکیل کپسول ها، و ارزیابی کیفی کپسول های ایجاد شده، مشخصات و کیفیت باکتری کپسوله شده شامل: اندازه ذرات و نحوه پراکنش ذرات (با استفاده از دستگاه پارتیکل سایزر)، پتانسیل زتا (با استفاده از دستگاه زتا آنالایزر)، شکل و نحوه پراکنش ذرات با میکروسکوپ فاز کنتراست مشخص گردیدند. جهت بررسی اندازه کپسول های تولیدی و فراوانی هر یک از آن ها از دستگاه اندازه گیری قطر ذرات استفاده شد. در این روش کپسول ها در آب مقطر دو بار تقطیر پراکنده و نتایج براساس قطر حجم میانگین (VMD) ذرات استاندارد خطا، dpeak و همچنین d10، d50 و d90 گزارش شدند (۱۵).

طراحی تحقیق: برای این مرحله لاکتوباسیلوس بولگاریکوس

کپسوله شده به خوراک بچه ماهی تیلاپیا اضافه شد و اثرات آن ها مورد

موئینه و دستگاه میکروسانتزیفیوژ و قرائت نتایج توسط خط کش مخصوص انجام شد (روش میکروهماتوکریت) (۲۰). پس از تهیه گسترش خون و فیکس نمودن با اتانول، نمونه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا رنگ‌شده و تعداد صد عدد گلبول سفید در هر لام شمارش و نسبت انواع گلبول‌های سفید مشاهده گردید (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: ارزیابی نتایج و تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS انجام و سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p < 0.05$ برای کلیه داده‌ها اعمال گردید. برای تعیین سطح معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۷) رسم شدند.

نتایج

شاخص رشد ویژه در گروه تغذیه‌شده با خوراک حاوی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده (B) در انتهای دوره پرورش از همه تیمارها بیش‌تر بود و با سایر گروه‌ها (A، C و D) اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در گروه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با ریز ذرات آلژینات کیتوزان مشاهده شده و این کاهش در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ($P > 0.05$). وزن نهایی، درصد بازده غذایی و کارایی پروتئین در گروه تغذیه‌شده با خوراک حاوی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با ریز ذرات آلژینات/کیتوزان (B) افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$).

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: جهت سنجش فاکتورها از فرمول‌های توصیه‌شده توسط Houde و Schekter استفاده شد (۱۸). در روز ۶۰ آزمایش با استفاده از ماده بی‌هوشی ۲-فنوکسی اتانول (۳/۰ میلی‌لیتر در لیتر) ماهیان بی‌هوش شدند. پس از وزن‌کشی و بیومتری ماهیان با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) و خط‌کش مدرج حرفه‌ای، شاخص‌های رشد براساس رابطه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفت: ضریب رشد ویژه (SGR) = $100 \times (\text{دوره پرورش به روز} / \ln w_2 - w_1)$ ضریب تبدیل غذایی (FCR) = $\text{میزان کل وزن تر کسب‌شده (گرم)} / \text{میزان غذای دریافت شده (گرم)}$ میزان بازده غذایی (FER) = $\text{افزایش وزن بدن (گرم)} / \text{مقدار غذای خورده شده (گرم)}$

میزان کارایی پروتئین (PER) = $\text{میزان وزن تر کسب‌شده (گرم)} / \text{میزان کل پروتئین دریافت شده}$
میزان رشد روزانه (DWG) = $\text{میانگین وزن نهایی} - \text{میانگین وزن اولیه (گرم)} / \text{تعداد روزهای آزمایش (d)}$

شمارش سلول‌های خونی (تعداد کل گلبول‌های قرمز و

سفید): شمارش سلول‌های خونی با روش رقیق‌سازی خون در محلول Natt-Herrick و استفاده از لام هموسیتمتر انجام پذیرفت، نهایتاً با استفاده از فرمول و نسبت رقیق‌سازی تعداد کل گلبول‌ها محاسبه شد (۱۹). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر از خون به ۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین اضافه‌شده و پس از مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق جذب تمام نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شدند (۲۰). شمارش سلول‌های خونی با روش رقیق‌سازی خون در محلول Natt-Herrick و استفاده از لام هموسیتمتر انجام گردید (۱۹). اندازه‌گیری هماتوکریت با استفاده از روش سانتزیفیوژ خون در لوله

جدول ۲: مقایسه نتایج برخی شاخص‌های رشد در دو مرحله نمونه‌گیری بین تیمارهای تحقیق (Mean±S.E)

تیمارهای تحقیق	زمان	کارایی پروتئین	میزان رشد ویژه (%/day)	نسبت بازده غذایی (%)	ضریب تبدیل غذایی	وزن نهایی (g)
A	روز ۳۰	۶۳/۵۱±۳/۰۱ ^b	۰/۶۵±۰/۰۰ ^a	۶۸/۳۲±۰/۳۲ ^a	۱/۴۶±۰/۰۱ ^b	۲۱/۱۸±۰/۱۰ ^a
B		۶۱/۶۸±۴/۴۶ ^a	۰/۷۰±۰/۰۴ ^a	۷۰/۷۰±۵/۳۹ ^a	۱/۴۲±۰/۱۱ ^b	۲۲/۸۰±۱/۱۹ ^a
C		۴۶/۸۳±۴/۰ ^b	۰/۵۶±۰/۰۴ ^b	۵۷/۳۰±۱/۴۰ ^b	۱/۷۵±۰/۰۴ ^a	۱۷/۱۹±۱/۱۸ ^b
D		۴۶/۸۰±۳/۳۳ ^b	۰/۵۶±۰/۰۳ ^b	۵۸/۲۰±۰/۲۶ ^b	۱/۷۲±۰/۰۱ ^a	۱۷/۴۶±۱/۰۵ ^b
A	روز ۶۰	۱۲۲/۸۷±۵/۱۹ ^b	۰/۷۰±۰/۰۳ ^b	۶۴/۳۳±۱/۵۹ ^b	۱/۵۶±۰/۰۴ ^b	۴۲/۹۱±۰/۷۷ ^b
B		۱۲۷/۱۲±۶/۸۴ ^a	۰/۷۱±۰/۰۳ ^a	۶۷/۱۴±۲/۲۸ ^a	۱/۴۹±۰/۰۵ ^c	۴۷/۰۰±۱/۶۰ ^a
C		۱۰۴/۸۸±۳/۷۴ ^c	۰/۶۲±۰/۰۳ ^b	۵۵/۰۴±۱/۰۳ ^c	۱/۸۲±۰/۰۳ ^a	۳۸/۵۳±۰/۷۲ ^c
D		۱۰۱/۸۷±۱/۵۱ ^c	۰/۶۲±۰/۰۱ ^b	۵۴/۳۳±۰/۵۶ ^c	۱/۸۴±۰/۰۳ ^a	۳۸/۰۳±۰/۳۹ ^c

A: بولگاریکوس، B: بولگاریکوس ریزپوشانی شده، C: آلژینات کیتوزان، D: شاهد، تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و مرحله نمونه‌گیری با حروف کوچک لاتین متفاوت مشخص شده است.

جدول ۳: مقایسه نتایج برخی شاخص های خونی در سه مرحله نمونه گیری بین تیمارهای تحقیق (Mean±S.E)

تیمارهای تحقیق	زمان	گلبول های سفید ($\times 10^3$)	هماتوکریت (%)	هموگلوبین (g/dl)	گلبول های قرمز ($\times 10^6$)
A	روز صفر	۱۷/۷۴±۲/۴ ^a	۲۶/۷۵±۲/۷۵ ^a	۵/۱۶±۰/۹۳ ^a	۱/۴۷±۰/۳۳ ^a
B		۱۶/۰۵±۱/۵۹ ^a	۲۹/۷۵±۳/۸۶ ^a	۵/۰۵±۱/۸۹ ^a	۱/۶۶±۰/۲۷ ^a
C		۱۵/۷۵±۰/۷۱ ^a	۲۹/۵۰±۱/۲۹ ^a	۴/۸۴±۰/۸۵ ^a	۱/۷۶±۰/۶۱ ^a
D		۱۵/۷۵±۰/۷۱ ^a	۲۹/۵۰±۱/۲۹ ^a	۴/۸۴±۰/۸۵ ^a	۱/۷۶±۰/۶۱ ^a
A	روز ۳۰	۱۷/۲۵±۱/۶۶ ^a	۲۷/۰۰±۲/۴۵ ^a	۵/۶۰±۰/۶۴ ^a	۱/۵۷±۰/۴۳ ^a
B		۱۷/۰۷±۱/۷۱ ^a	۲۷/۰۰±۱/۸۳ ^a	۵/۵۴±۱/۶۴ ^a	۱/۵۹±۰/۱۴ ^a
C		۱۷/۱۵±۲/۷۵ ^a	۲۷/۲۵±۵/۲۵ ^a	۵/۶۲±۱/۸۷ ^a	۱/۵۷±۰/۴۰ ^a
D		۱۶/۶۴±۱/۸۶ ^a	۲۹/۰۰±۱/۱۵ ^a	۴/۳۳±۰/۳۱ ^a	۱/۵۷±۰/۲۳ ^{aa}
A	روز ۶۰	۱۶/۱۰±۱/۶۶ ^a	۲۸/۵۲±۲/۶۵ ^a	۵/۴۱±۰/۵۴ ^a	۱/۸۱±۰/۶۱ ^a
B		۱۵/۶۴±۱/۸۶ ^a	۲۹/۰۰±۲/۱۶ ^a	۵/۳۰±۱/۶۵ ^a	۱/۷۶±۰/۱۷ ^a
C		۱۶/۰۰±۲/۷۵ ^a	۲۸/۲۵±۵/۲۵ ^a	۴/۸۷±۱/۲۳ ^a	۱/۶۹±۰/۴۰ ^a
D		۱۵/۴۹±۱/۵۶ ^a	۳۰/۵۰±۱/۹۱ ^a	۴/۱۸±۰/۳۹ ^a	۱/۵۶±۰/۳۴ ^a

A: بولگاریکوس، B: بولگاریکوس ریزپوشانی شده، C: آلژینات کیتوزان، D: شاهد، تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون و مرحله نمونه گیری با حروف کوچک لاتین متفاوت مشخص شده است.

بحث

در این تحقیق تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده به خوراک ماهی تیلپیا باعث بهبود تقریباً تمام شاخص های رشد نسبت به تیمار شاهد گردید. به طوری که میزان رشد میان دوره و پایان دوره، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، میزان کارایی پروتئین و درصد افزایش وزن در تیمار تغذیه شده با خوراک حاوی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد بهتر بود ($P < 0/05$). گزارش های متعددی از تأثیر تجویز پروبیوتیک ها در بهبود رشد ماهی تیلپیا در منابع مشاهده می شود، به عنوان مثال: میزان رشد و هضم غذا در تیلپای نیل جوان با استفاده از ترکیب خوراکی باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس و هم چنین باسیلوس سرئوس به تنهایی به طور معنی داری بهبود یافت (۲). در تحقیق دیگری میزان رشد تیلپیا با استفاده از ترکیب خوراکی لاکتوباسیلوس پلانتروم و باسیلوس سوبتیلیس و هم چنین مخلوط خوراکی لاکتوباسیلوس پلانتروم، باسیلوس سوبتیلیس و ساکارومایسس سرویزیه بهبود قابل توجهی پیدا کرد (۲۱). در پژوهش دیگری مشخص گردید در صورتی که ۲۷ یا ۴۰ درصد از پروتئین خام جیره غذایی تیلپای نیل از پروبیوتیک یا مخلوط از چندین پروبیوتیک تشکیل شود، میزان ضریب تبدیل غذایی و وزن ماهیان در مقایسه با جیره معمولی بهبود می یابد (۲۲). هم چنین در تحقیق Han و همکاران، پس از ۱۰ هفته دوره پرورش و تغذیه با باسیلوس لیچنیفورمیس شاخص های رشد تیلپیا بهبود

معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (۲۳). Mahmoud و همکاران، اثر سینرژیستی لاکتوباسیلوس پلانتروم و بتا گلوکان (۹) و Van و همکاران، اثر پروبیوتیک لاکتولاسیلوس پلانتروم (سویه L-137) را بر بهبود شاخص های رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی و بیان ژن های مرتبط با متابولیسم ماهی تیلپیا گزارش نمودند (۲۴). علی رغم گزارش ها متعدد بهبود شاخص های رشد ماهی تیلپیا به دنبال تجویز پروبیوتیک های بومی و تجاری، گزارش ها مربوط به تجویز پروبیوتیک ریزپوشانی شده با ریز ذرات زیست تخریب پذیر انگشت شمار است. و به جرات می توان گفت که ریزپوشانی پروبیوتیک با ریز ذرات آلژینات / کیتوزان به روش امولسیون داخلی و تجویز آن به ماهی تیلپیا که در این تحقیق استفاده شد، مشابهی در گزارش ها و منابع منتشر شده نداشته است. در تحقیقات محدود مربوط به ریزپوشانی پروبیوتیک نتایج مشابهی با تحقیق حاضر حاصل شده است، مثلاً: Pinpimai و همکاران، اثر ریزپوشانی ساکارومایسس سرویزیه با ریز ذرات آلژینات را در ماهی تیلپیا بررسی نمودند. آن ها ریزپوشانی این باکتری را باعث افزایش توان پروبیوتیکی آن گزارش نمودند (۲۵). هم چنین Lukman و همکاران، اثر بهبود رشد و سلامت ماهی تیلپیا به دنبال تجویز خوراکی پروبیوتیک ریزپوشانی شده باسیلوس NP5 و پروبیوتیک و هم چنین تجویز سین بیوتیکی آن ها گزارش کردند (۲۶). Pirarat و همکاران، اثر لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده در خوراک را بر شاخص های رشد و میکروپرزهای روده ماهی تیلپیا گزارش نمودند. به طوری که ارتباط مستقیمی بین رشد و تعداد میکروپرزهای روده و شاخص های ایمنی ماهی تیلپیا مشاهده شد (۲۷). مشابه

یافته حاضر، Pirarat و همکاران (۲۸) و Goncalves و همکاران (۲۹) گزارش کردند که شاخص‌های رشد ماهی تیلاپیا با تجویز لاکتوکوکوس رامنوسوس ریزپوشانی شده با آلژینات افزایش قابل توجهی پیدا کرده است. آلژینات علاوه بر این که پلی ساکاریدی به دست آمده از جلبک قهوه‌ای است، به عنوان یک پره‌بیوتیک نیز شناخته شده و می‌تواند به طور انتخابی رشد باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش را تحریک کرده و منجر به افزایش رشد ماهیان شود (۳۰). کیتوزان هم با ساختار خاص پلیمری خود علاوه بر زیست تخریب پذیر بودن مقاومت بالایی در برابر اسید معده از خود نشان داده و می‌تواند باعث حفظ بقای پروبیوتیک در شرایط اسیدی معده ماهی گردد. یکی از دلایل اصلی بهبود شاخص‌های رشد ماهی تیلاپیا در تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده با ریز ذرات آلژینات/کیتوزان، محافظت مناسب پروبیوتیک در لوله گوارش ماهی به ویژه در شرایط اسیدی معده و همچنین شرایط قلیایی روده و نمک‌های صفراوی و آنزیم‌های ابتدای روده است. به طوری که Standen و همکاران (۳۱) هم‌چنین Mohammadian (۳۲) بهبود بازماندگی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کازی را در شرایط مشابه سازی شده معده و روده ماهی گزارش کردند. از طرفی ثابت شده است که ریز ذرات زیست تخریب پذیر با ساختار پلیمریک مثل کیتوزان و آلژینات می‌توانند مانند یک محرک ایمنی ذاتی با بهبود کارایی آنزیم‌های گوارشی و همچنین تحریک ترشح سایتوکین‌های وابسته به ایمنی در روده، بهبود سلامت و مقاومت ماهی را باعث شوند (۶، ۱۱) این بهبود شاخص‌های سلامت و مقاومت ماهی در برابر عوامل عفونی می‌تواند به صورت غیرمستقیم شاخص‌های رشد ماهی را نیز تحت تأثیر قرار داده و احتمالاً قسمتی از بهبود شاخص‌های رشد مشاهده شده در تحقیق می‌تواند به این عامل نسبت داده شود (۳۳). در تحقیقی توسط Mohammadian در استفاده از خوراک حاوی سه پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازی) روی ماهی شیربت در نتایج چنین بیان کرد که تیمار حاوی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس دارای تأثیر مفید روی رشد و سیستم ایمنی ذاتی، ماهی شیربت بود (۳۲). در آزمایش چالش عفونت باکتریایی ماهیان با باکتری آئروموناس هیدروفیلا، تیمارهای حاوی پروبیوتک درصد زنده‌مانی بیش تر و معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. با این وجود عدم تأثیر مثبت برخی سویه‌های پروبیوتیکی بر روی رشد ماهی تیلاپیا نیز گزارش شده است. در تحقیق Addo و همکاران، بعد از یک دوره ۲۱ روزه تغذیه توسط باسیلوس سوبتیلیس میزان رشد تیلاپیا مشابه با گروه شاهد ثبت گردید (۳۴). Ahmadmoradi و همکاران، اثر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با آلژینات کیتوزان (10^8 cfu/ گرم) را بر روی فاکتورهای خونی و رشد قزل‌آلای رنگین کمان بررسی کرده و

بهبود برخی فاکتورها (ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین) را مشاهده کردند (۳۵). در پژوهش مشابه دیگری Gholipour و همکاران، اثر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با آلژینات کیتوزان (10^8 cfu/ گرم) را بر روی فاکتورهای رشد ماهی باس دریایی آسیایی بررسی کرده و بیش‌ترین میزان رشد در روز ۶۰ تحقیق در گروه باکتری ریزپوشانی شده را مشاهده کردند (۳۶). در آبی‌پروری فاکتورهای خونی به عنوان یک ابزار حیاتی برای تعیین تغییرات فیزیولوژیکی و وضعیت سلامت ماهیان محسوب می‌شود (۳۷). استفاده از شاخص‌های خونی معمولاً به چند منظور است، برخی افزودنی‌های خوراکی علی‌رغم بهبود برخی شاخص‌های مهم مثل شاخص‌های رشد و ایمنی، می‌توانند اثرات توکسیک در تجویزهای طولانی داشته و برای پی بردن به این اثرات توکسیک، شاخص‌های خونی یکی از بهترین گزینه‌هاست (۳۸). از طرفی شاخص‌های خونی به شدت تحت تأثیر سلامت ماهی قرار می‌گیرند، یعنی بهبود سلامت ماهی معمولاً با بهبود شاخص‌های خونی ماهی همراه است (۳۹). لذا منطقی است که بهبود رشد و سلامت ماهی، بهبود شاخص‌های خونی ماهی به ویژه شاخص‌های مربوط به گلبول‌های قرمز را باعث شود. در تحقیق حاضر بهبود نسبی برخی شاخص‌های خونی به دنبال تجویز پروبیوتیک و پروبیوتیک ریزپوشانی شده دیده شد ولی این میزان از نظر آماری معنی‌دار نبود احتمالاً با افزایش دوز یا مدت تجویز پروبیوتیک ریزپوشانی شده بهبود شاخص‌های خونی به طور مشهودتر و معنی‌داری ایجاد خواهد شد. البته عدم اختلال در روند خون‌سازی و شاخص‌های خونی نیز دلیلی بر عدم سمیت و آسیب بافتی پروبیوتیک و مواد ریزپوشانی مورد استفاده است. گزارش‌ها در مورد تأثیر تجویز پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های خونی بسیار متنوع و گاهی متناقض است. مثلاً در تحقیق Hassaan و همکاران (۴۰) و Mohammadian (۳۲) افزایش معنی‌دار در میزان هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در پاسخ به جیره حاوی پروبیوتیک گزارش شده است، همچنین Amir و همکاران، پروبیوتیک گنتریچوم کاندیدوم ریزپوشانی شده با کیتوزان آلژینات را به مدت ۱۱ هفته در جیره ماهی روگو اضافه کرده و افزایش معنی‌دار در میزان گلبول‌های قرمز و سفید، هماتوکریت و هموگلوبین، پروتئین تام گزارش نمودند (۱۱). ولی در گزارش Mehrabi و همکاران، تجویز پروبیوتیک در ماهی کپور را بدون تأثیر بر شاخص‌های خونی وابسته به گلبول‌های قرمز دانستند (۴۱). هم‌چنین Saravanan و همکاران، تجویز پروبیوتیک را بدون تأثیر معنی‌دار بر شاخص‌های خونی ماهی روگو دانستند (۴۲). به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که نه تنها تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس خوراکی به تنهایی باعث بهبود شاخص‌های رشد ماهی تیلاپیا می‌شود، بلکه ریزپوشانی این پروبیوتیک

11. Amir, I., Zuberi, A., Kamran, M. and Imran, M., 2019. Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. Fish and shellfish immunology. 95: 464-472.
12. AbdelAllah, N.H., Abdeltawab, N.F., Boseila, A.A. and Amin, M.A., 2016. Chitosan and sodium alginate combinations are alternative, efficient, and safe natural adjuvant systems for hepatitis B vaccine in mouse model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
13. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M.Z., 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate polymers. 86(1): 142-146.
14. Maria, K., Sharif, J., Maria, E.R., Guillaume, D., Ludovic, H., Alexandre, D., Florane, L.B., Jerome, C., Vincent, C., Khalef, R., Gaby, K. and Rachid, A., 2020. Juvenile fish caging as a tool for assessing microplastics contamination in estuarine fish nursery grounds. Environmental Science and Pollution Research. 27(4): 3548-3559. DOI: 10.1007/s11356-018-3345-8.
15. 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(8): 1040-1045.
16. Planas, M., Chamorro, A., Paltrinieri, A., Campos, S., Jiménez, A., Nedelec, K. and Hernández-Urcera, J., 2020. Effect of diet on breeders and inheritance in syngnathids: application of isotopic experimentally derived data to field studies. Mar Ecol Prog Ser. 650: 107-123. DOI: 10.3354/meps13315
17. Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiology Reviews. 30: 404-427.
18. Houde, E.D. and Schekter, R.C., 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer. 178: 441-453.
19. Thrall, M.A., 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 241-402.
20. Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jian, N.C., 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins publication, Canada. 1120-1125.
21. Essa, M.A., El-Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboor, S.M., Esmael, N.A. and Lall, S.P., 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Arabian Aquaculture Society. 5(2): 143-161.
22. Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L. and Olvera Novoa, M.A., 2010. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Fish Aquaculture. 2(40): 93-101.
23. Han, B., Long, W.Q., He, J.Y., Liu, Y.J., Si, Y.Q. and Tian, L.X., 2015. Effects of dietary *Bacillus*

با ریزذرات آلژینات/کیتوزان ارتقای معنی دار شاخص های رشد نسبت به تیمار پروبیوتیکی بدون ریزپوشانی را باعث شده است. می توان با توجه به ارزان و در دسترس بودن آلژینات و کیتوزان از آن ها برای ریزپوشانی پروبیوتیک های آبزیان با دوز پیشنهادی (10^8 cfu/ گرم) به ویژه ماهی تیلاپیا استفاده کرد. از طرفی علی رغم تأثیر قابل توجه پروبیوتیک ریزپوشانی شده بر شاخص های رشد ماهی تیلاپیا، شاخص های خونی این ماهی با دوز و مدت زمان تجویز پروبیوتیک تعریف شده در تحقیق تحت تأثیر قرار نگرفت.

منابع

1. FAO. 2020. The State of Food and Agriculture 2020. Overcoming water challenges in agriculture. Rome. DOI: 10.4060/cb1447en
2. Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M. and Chen, G., 2020. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animal Nutrition. 6(1): 69-79.
3. Vazirzadeh, A., 2017. Tilapia Farming in Iran: Savior of Aquaculture or Destroyer of Environment. Shil Science Journal. 5(3): 104-110.
4. Khanzadeh, M., Vazirzadeh, A. and Farhadi, A., 2020. Effect of Extract and Fucoidan of Sargassum sp. on Growth, biochemical, Immunity and antioxidant Parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 29(4): 97-108. DOI: 10.22092/ISFJ.2020.122997. (In Persian)
5. Dawood, M.A.O., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M. and Van Doan, H., 2019. Probiotic application for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture. 11: 907-924.
6. Jahari, M.A., Mustafa, S., Abd Manap, Y., Udin Lamasudin, D. and Roslan, M.A.H., 2019. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with mannan and sodium alginate improves its cell production. Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology. 7(1): 17-22.
7. Sindhu, S.C. and Khetarpaul, N., 2001. Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on antinutrients and digestibility of starch and protein. J Food Composition and Analysis, Compos Anal. 14(6): 601-619
8. Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchietti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D. and Davies, S.J., 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production—a Mediterranean perspective. Fish and Shellfish Immunology. 30(1): 1-6.
9. Dawood, M.A.O., Magouz, F.I., Salem, M.F.I., Elbially, Z.I. and Abdel-Daim, H.A., 2020. Synergetic effects of lactobacillus plantarum and β -glucan on digestive enzyme activity, intestinal morphology, growth, fatty acid, and glucose-related gene expression of genetically improved farmed tilapia. Probiotics and Antimicrobial Protins. 12: 389-399. DOI: 10.1007/s12602-019-09552-7
10. Chen, K.N., Chen, M.J., Liu, J.R., Lin, C.W. and Chiu, H.Y., 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. Journal of Food Science. 70(5): 260-266.

- Oreochromis niloticus*. Journal of World Aquaculture Society. 48(2): 257-267.
35. Ahmadmoradi, M., Soltanian, S., Alishahi, M., Akhlaghi, M., Shahriari, A. and Yektaseresht, A., 2019. Effect of *Lactobacillus plantarum* nano-micro encapsulated with alginate/chitosan on growth performance, nutritional indices and Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal Environment. 11(1): 231-238. DOR: 20.1001.1.27171388.1398.11.1.26.6. (In Persian)
 36. Gholipour, M., Soltanian, S., Akhlaghi, M., Alishahi, M., Mirbakhsh, M. and Gheysari, H., 2020. The effect of encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with Alginate/Chitosan Nano particles on growth performance and digestive enzyme activities in Asian sea bass (*Lates calalifer*). Journal of Animal Environment. 12(3): 197-206. DOI: 10.22034/aej.2020.114800. (In Persian)
 37. Ullah, A., Zuberi, A., Ahmad, M., Bashir Shah, A., Younus, N. and Ullah, S., 2018. Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (*Cirrhinus mrigala*) in a natural earthen polyculture system. Fish and Shellfish Immunology. 72: 266-272.
 38. Tachibana, L., Telli, G.S., de Carla Dias, D., Gonçalves, G.S., Ishikawa, C.M., Cavalcante, R.B., Natori, M.M., Hamed, S.B. and Ranzani-Paiva, M.J.T., 2020. Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. Aquaculture Reports. 16: 100277.
 39. Silva, T.F.A., Petrillo, T.R., Yunis-Aguinaga, J., Marcusso, P.F., da Silva Claudiano, G. and de Moraes, M., 2015. Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. Latin American Journal of Aquatic Research. 43(5): 963-971.
 40. Hassaan, M., Soltan, M. and Ghonemy, M., 2014. Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egypt Journal of Aquaculture. Research. 40: 199-208.
 41. Mehrabi, F., Khalesi, M. and Hazaie, K., 2018. Effects of pre-and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry from the Caspian Sea. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 18(4): 597-602.
 42. Saravanan, K., Sivaramakrishnan, T., Praveenraj, J., Kiruba-Sankar, R., Haridas, H., Kumar, S. and Varghese, B., 2021. Effects of single and multi-strain probiotics on the growth, hemato-immunological, enzymatic activity, gut morphology and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita*. Aquaculture. 540: 736-749.
 24. Van Nguyen, N., Onoda, S., Van Khanh, T., Duy Hai, P., Trung, N.T., Hoang, L. and Koshio, S., 2019. Evaluation of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 498: 371-379.
 25. Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, C., Katagiri, T., Pirarat, N. and Maita, M., 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Research in Veterinary Science. 102: 103-111.
 26. Lukman, A.W. and Munti, Y., 2015. Application of micro-encapsulated Probiotic Bacillus NP5 and Prebiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) to Prevent Streptococcosis on Tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Microbiology. 10(12): 571-581.
 27. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M. and Endo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Immunology and Immunopathology. 113: 339-347.
 28. Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E.L., Katagiri, T. and Maita, M., 2015. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. Animal Feed Science and Technology. 207: 93-103.
 29. Gonçalves, A., Maita, M., Futami, K., Endo, M. and Katagiri, T., 2011. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fisheries Science. 77: 633-642.
 30. O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P.G., Hughes, H. and Gardiner, G.E., 2010. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. Marine Drugs. 8: 2038-2064.
 31. Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D., Davies, S., Santos, G. and Merrifield, D., 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Applied Microbiology and Biotechnology. 99(20): 8403-8417.
 32. Mohammadian, T., 2013. Evaluation of the probiotic power and immune stimulation of some lactobacilli isolated from the intestine of barbus grypus. Ph. D thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Veterinary Medicine. 184 p.
 33. Martinez, R.C.R., Bedani, R. and Saad, S.M.I., 2015. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. British Journal of Nutrition, Br J Nutr. 114(12): 1993-e2015.
 34. Addo, S., Carrias, A.A., Williams, M.A., Liles, M.R., Terhune, J.S. and Davis, D.A., 2017. Effects of *Bacillus subtilis* strains on growth, immune parameters, and *Streptococcus iniae* susceptibility in Nile Tilapia,