فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال یازدهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

اثر باکتری‌های پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* بر کنترل قارچ‌زدگی و عملکرد تخم‌گشایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

امید رحمتی[۱]، سعید ضیائی‌نژاد[۲]*، علی آبرومند[۲]، اسماعیل کاظمی[۳]

DOI: 10.22124/japb.2022.22297.1465
تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

چکیده

در صنعت تکثیر و پرورش ماهی برای پیشگیری از آلودگی قارچی تخم‌ها در طی دوره انکوباسیون از مواد ضدعفونی کننده متعددی استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به فرمالین، آب اکسیژنه، پرمنگنات پتاسیم و غیره اشاره کرد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر باکتری‌های پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* با غلظت‌های ۱ و ۲ گرم (افزودن به آب) در کنترل آلودگی قارچی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله انکوباسیون و مقایسه تاثیرات آن با فرمالین و آب مقطر (شاهد) بود. برای انجام این مطالعه از ۱۸ تراف کالیفرنیایی برای شش تیمار با سه تکرار استفاده شد و به هر تراف تعداد ۱۸۵۰ تخم لقاح یافته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انتقال یافت. پس از آماده شدن سینی‌ها و توزیع تخم‌ها، در هر تیمار برای ضدعفونی تخم‌ها از یک سرم مجزا استفاده شد. مدت زمان تخلیه کامل هر سرم ۵۰ دقیقه بود. نتایج نشان داد در تیمارهای حاوی فرمالین (۱۰±۱ درصد) و پس از آن *L. plantarum* ۲ گرم (۳/۲۱±۱۵/۳۳ درصد) کمترین میزان قارچ‌زدگی تخم‌ها مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان چشم‌زدگی (۰/۵۸±۸۴/۶۷ درصد) و تخم‌گشایی (۱±۸۱ درصد) در تیمار فرمالین مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این باکتری‌های پروبیوتیکی می‌توانند تا حدی از رشد قارچ *Saprolegnia* جلوگیری کند. احتمالا با مطالعات بیشتر می‌توان به اثرات مثبت این پروبیوتیک‌ها در کنترل قارچی و مدیریت بهداشتی در مراکز تکثیر ماهی قزل‌آلا امیدوار بود.

واژگان کلیدی: *تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان*، Saprolegnia، *پروبیوتیک*، *قارچ‌زدگی*.

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران.
۳- دکتری شیلات، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، یاسوج، ایران.
* نویسنده مسئول: zbsaeed@yahoo.com

مقدمه

افزایش تولید و اقتصادی شدن آبزی‌پروری مستلزم افزایش تراکم است که متعاقب آن ماهی با شرایط استرس‌زا و بیماری مواجه خواهد شد. در چند دهه اخیر برای پیشگیری و کنترل بیماری‌ها از مواد شیمیایی و داروهای مختلف مانند آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان راهکار معمول استفاده شده است. به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی و همچنین به عنوان یک اقدام پیش‌گیرانه یا درمان بیماری‌های ماهی بحث برانگیز بوده است. از آن جایی که گزارش‌های متعددی از بروز مقاومت ضدمیکروبی و خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان وجود دارد. از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مهار و از بین بردن میکروبیوتای طبیعی و مفید و همچنین اثرات طولانی مدت و غیرقابل پیش‌بینی بر سلامت عموم می‌شوند. مشکل دیگری که به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری ایجاد می‌شود، عدم کارایی آنها بر ضد تشکیل بیوفیلم توسط عوامل بیماری‌زای باکتریایی است و حذف این بیوفیلم‌های باکتریایی بسیار دشوار است (Fuente et al., 2015). از این رو، نیاز به روش‌های جایگزین بیش از پیش ضرورت می‌یابد. یکی از مهم‌ترین روش‌های ارتقای سلامت، افزایش رشد و کنترل بیماری و عوامل بیماری‌زا در صنعت آبزی‌پروری استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی است (Wang et al., 2008; Pandiyan et al., 2013; Michael et al., 2014). پروبیوتیک‌ها می‌توانند برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان ابزاری جایگزین در آبزی‌پروری پایدار به کار برده شوند.

بیماری‌های عفونی و قارچی از جمله مشکلات صنعت آبزی‌پروری است که با توسعه پرورش متراکم آبزیان موجب بروز خسارات فراوان به پرورش دهندگان می‌شود (ابراهیم‌زاده موسوی و همکاران، ۱۳۸۶). قارچ‌های آبزی از جمله عوامل آسیب‌رسان به صنعت تکثیر و پرورش آبزیان به شمار می‌روند و موجب مرگ و میر وسیعی در آبزیان می‌شوند (Forneris et al., 2003). قارچ‌های خانواده Saprolegniaceae از مهم‌ترین قارچ‌های ایجاد کننده ساپرولگنیازیس در ماهیان و تخم آنها هستند. از جمله روش‌های معمول در درمان بیماری قارچی ساپرولگنیازیس استفاده از داروهای شیمیایی است. مالاشیت گرین از جمله داروهایی است که به دلیل اثرات مطلوب قارچ‌کشی و سهولت استفاده از آن در درمان ساپرولگنیازیس، همیشه توسط بخش تکثیر و

پرورش ماهی مورد استفاده قرار می‌گرفت (Howe et al., 1999). تا این که در سال ۱۹۹۱ اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) استفاده از این دارو را ممنوع اعلام کرد (Marking et al., 1994; Pottinger and Day, 1999). در حال حاضر، پیشگیری و درمان ساپرولگنیازیس بر اساس استفاده از محصولات شیمیایی است که ممکن است برای محیط زیست (Willoughby and Roberts, 1992; Schreier et al., 1996) و سلامت مصرف کننده در صورت باقی ماندن بقایای آن در بافت ماهی (Kitancharoen and Hatai, 1997) خطر آفرین باشد. علاوه بر این، هیچ یک از ترکیبات موجود پس از دوره پرورش محافظت کافی را ارائه نمی‌دهند (Forneris et al., 2003).

اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها در استخرهای آبزی‌پروری شامل بهبود کیفیت آب، افزایش کارایی تغذیه میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی، کاهش شیوع بیماری، بقای بیشتر و بهبود پاسخ ایمنی است (Boyd and Massaaut, 1999; Verschuere et al., 2000). با استفاده از باکتری‌ها هم می‌توان تولید را افزایش داد، هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم این که به عنوان مبارزه بیولوژیک مدنظر قرار داد (پورامینی و حسینی‌فر، ۱۳۸۶). توسعه پایدار آبزی‌پروی در بخش کشاورزی نیازمند تکنیک‌های نوین است. در بین تکنیک‌های معرفی شده، استفاده از باکتری‌های مفید یا پروبیوتیک با اهدافی مانند بهینه‌سازی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در محیط پرورشی آبزیان، مصرف بهینه و افزایش کارایی بهره‌برداری از آب و همچنین ارتقای عملکرد رشد آبزیان صورت می‌گیرد. برخی از باکتری‌های مفید به عنوان یک مکمل غذایی میکروبی زنده، همراه غذا، غنی‌سازی با غذای زنده مورد استفاده و یا مصرف مستقیم آنها در آب محیط پرورشی، موجب سازگاری اکولوژیکی، ارتقای عملکرد تولید ماهی و بهینه‌سازی جمعیت میکروبی محیط پرورش آبی آنها می‌شود. ماهیان پرورشی برای تامین پروتئین کشور دارای اهمیت تغذیه‌ای و اقتصادی بالایی هستند. توسعه سیستم‌های پرورشی این ماهیان می‌تواند نقش بسیار مهمی را در ارتقای پایدار آبزی‌پروری ایفا کند (جعفریان، ۱۳۸۵). استفاده بیش از حد از داروهای ضدباکتریایی، حشره‌کش‌ها و مواد ضدعفونی کننده در آبزی‌پروری موجب شکل‌گیری گونه‌های میکروبی مقاوم و در نتیجه بروز نگرانی شده است (Esiobu et al., 2002).

از این رو، استفاده از پروبیوتیک‌ها در پرورش آبزیان به دلیل اهمیت آنها در محافظت آبزی در برابر عوامل بیماری‌زا، افزایش سلامت آبزی به واسطه ترشح آنزیم‌های گوارشی و عناصر مغذی و بهبود کیفیت آب و خاک در حال افزایش است (Defoirdt et al., 2011).

گونه‌های جنس *Bacillus* به صورت گسترده به عنوان پروبیوتیک به کار می‌روند، زیرا آنها به طور طبیعی در محیط یافت می‌شوند و دارای مکانیسم‌های مختلفی برای رقابت با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند. علاوه بر این، *Bacillus*ها سلامت آبزی و کیفیت آب را بهبود می‌بخشند و می‌توانند تغییرات pH، دما و شوری را تحمل کنند (Decamp et al., 2008). امروزه برخی باکتری‌های هالوفیل نیز به عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (Sekar and Packyam, 2014) که دارای فوایدی از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مانند باکتریوسین، لیپوپپتیدهای ضدباکتریایی و غیره هستند و به دلیل سمیت پایین و قابلیت تبدیل زیستی بالا توجه قابل ملاحظه‌ای را به عنوان مواد کنترل کننده زیستی به خود جلب کرده‌اند (Oliveira and Pijoan, 2004) جنس *Lactobacillus* از جمله مهم‌ترین، پرکاربردترین و موفق‌ترین پروبیوتیک‌های آبزیان است که بیش از ۵۰ گونه را شامل می‌شود (Tannock, 2004). این باکتری‌ها گرم مثبت، کروی، فاقد اسپور و غیر متحرک هستند که در فرایند تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. این باکتری‌ها عموما در محیط‌های سرشار از مواد مغذی مانند مواد غذایی مختلف (شیر، گوشت و سبزیجات)، مواد در حال فساد و تخمیر شده و سطح موکوسی دستگاه گوارش جانوران یافت می‌شوند (Salminen and Von Wright, 2004).

صنعت آبزی‌پروری با وجود رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی روبه‌رو بوده است که از آن جمله می‌توان به شیوع انواع بیماری‌های میکروبی، انگلی، ویروسی و قارچی، مرگ و میر ماهیان و همچنین مشکلات کیفیت آب و آلودگی‌های آب و بسیاری از مشکلات دیگر اشاره کرد. تولید لارو ماهیان از نظر کیفیت و کمیت لازمه افزایش تولیدات آبزی‌پروری در مزارع پرورش ماهیان است (Kjorsvik et al., 1990). این امر باعث شده است که حساسیت خاصی به مراحل تولیدمثلی ماهیان مانند رسیدگی جنسی، تخم‌ریزی و دوره رشد و نمو (از مرحله لقاح تا جذب کیسه زرده) در بین آبزی‌پروران ایجاد شود، به طوری که تولید لاروهای با کیفیت بالا باعث افزایش تولید و سود

اقتصادی پرورش دهندگان ماهی خواهد شد. محافظت و پیشگیری از عوامل بیماری‌زا، مهم‌ترین، آسان‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جلوگیری از صدمات و ضایعات ناشی از بیماری‌ها در مراکز تکثیر و پرورش است. بنابراین ضروری است که در پژوهش‌های شیلاتی توجه ویژه‌ای به موضوعات بهداشتی در زمینه تولید محصولات سالم و با کیفیت مبذول شود (Atanasov et al., 2011). امروزه اضافه کردن واسطه‌گرهای ایمنی مانند پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی، سیستم ایمنی غیراختصاصی را تحریک می‌کند. توجه به کاربرد این روش با پررنگ شدن مشکلات بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی و دیگر عوامل محدود کننده در بسیاری از مزارع پرورشی ماهی و مراکز تکثیر، افزایش یافته است (فروزانفر، ۱۳۸۴). مکانیسم‌های متعددی در بیان اثرات مفید پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است که از جمله آنها اثرات آنتاگونیستی نسبت به عوامل بیماری‌زا، رقابت برای جایگاه‌های اتصالی، رقابت برای مواد غذایی، کمک به گوارش مواد غذایی، تولید باکتریوسین و سیدروفور، بهبود کیفیت آب و تحریک پاسخ‌های ایمنی میزبان است (Tinh et al., 2007; Fuente et al., 2015).

مالاشیت گرین، فرمالین، پراکسید هیدروژن، کلریدهای سدیم و کلسیم، سولفات مس، یدوفورها، پرمنگنات پتاسیم، متیلن بلو و تانن از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده برای درمان قارچ‌زدگی تخم‌های لقاح یافته و ماهی‌ها بوده‌اند (Khodabande and Abtahi, 2006). اثرات مخرب تعدادی از مواد شیمیایی یاد شده از جمله مالاشیت گرین، کاربرد آنها را تا حد زیادی متوقف ساخته است و مواد دیگر یا دارای ملاحظات زیست‌محیطی هستند و یا از خاصیت قارچ‌کشی موثری برخوردار نیستند (Woo and Bruno, 2011). از این رو، جایگزین‌های دیگری که علاوه بر داشتن اثر مفید، به محیط زیست هم آسیب نرسانند، از جمله رقبای باکتریایی همچون *Pseudomonas* (پروبیوتیک) علیه قارچ *Saprolegnia* به عنوان کنترل کننده طبیعی قارچ در محیط آبی مورد توجه خاصی قرار گرفته است (Ghiasi et al., 2010). در پژوهش حاضر سعی شد تا با توجه به محدود بودن مطالعات در این زمینه، اثر ضدقارچی باکتری‌های پروبیوتیکی *Bacillus* و *Lactobacillus* در مقایسه با مواد مختلف ضدعفونی کننده در روند انکوباسیون و بر قارچ‌زدگی و عملکرد تخم‌گشایی تخم‌های

قزل‌آلای رنگین‌کمان در دوره تخم‌گشایی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی اولیه

این مطالعه در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انجام شد.

قبل از شروع آزمایش، محیط کارگاه، انکوباتور، سینی و وسایل مورد استفاده کاملا شست و شو و با استفاده از سولفات مس با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ضد عفونی شد (Oplinger and Wagner, 2013) و شیر آلات آب ورودی بررسی و کنترل و دبی آب ورودی تنظیم شد. انکوباتورها در مکان مناسب قرار داده شد و از سینی‌های هم حجم استفاده شد. آب از طریق چشمه و به صورت ثقلی تامین شد. همچنین در طول انجام این آزمایش، آب به صورت ثقلی از روی تراف ها جریان پیدا می‌کرد. آب ورودی از نظر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی شامل اکسیژن محلول، دما، pH و سختی کل با استفاده از دستگاه مولتی پارامتر (7200، EZDO، تایوان) به طور روزانه کنترل شد.

تهیه و تیماربندی تخم‌ها

تخم‌ها از مولدین ۴ ساله موجود در مرکز که از لحاظ ظاهری سالم و فاقد هر گونه علایم بیماری و ضایعات پوستی بودند، استحصال شدند. پس از لقاح، تخم‌ها شمارش و به ۶ گروه آزمایشی با سه تکرار برای هر گروه تقسیم شدند. در مجموع ۱۸ تراف برای انکوباسیون تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد استفاده قرار گرفت. در جدول ۱ نحوه تیماربندی آزمایش آورده شده است.

جدول ۱: داروهای ضدعفونی کننده همراه با مقدار مصرفی آنها

تیمارها	ترکیب مورد استفاده
اول	*Lactobacillus plantarum* (۱ گرم در لیتر)
دوم	*Lactobacillus plantarum* (۲ گرم در لیتر)
سوم	آب مقطر استریل (شاهد)
چهارم	فرمالین (۳۷ درصد)
پنجم	*Bacillus subtilis* (۱ گرم در لیتر)
ششم	*Bacillus subtilis* (۲ گرم در لیتر)

به منظور انجام آزمایش، ۲ ساعت پس از لقاح، با استفاده از یک پیمانه مدرج، تعداد

۱۸۵۰ تخم به هر سینی معرفی شد. تیماربندی و ذخیره‌سازی تخم‌های لقاح یافته در انکوباتورهای تراف عمودی (کالیفرنیایی) انجام گرفت. جریان آب ۳ لیتر در دقیقه در هر تراف تنظیم شد. به طور روزانه، تمامی مراقبت‌های لازم برای نگهداری و سپری شدن دوره انکوباسیون انجام گرفت.

برای تیمار تخم‌ها بر اساس جدول ۱، بعد از قرارگیری تخم‌ها به تراف، به طور روزانه با اضافه کردن باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* (ارجان زیست‌یار، ایران) به عنوان پروبیوتیک، فرمالین (۳۷ درصد) و آب مقطر استریل، تخم‌های لقاح یافته در سینی‌ها به طور مجزا به مدت ۵۰ دقیقه در معرض مواد یاد شده قرار گرفتند. نحوه استفاده از باکتری‌ها و مواد شیمیایی بالا به این ترتیب بود که میزان محاسبه شده هر ماده توزین و آماده می‌شد و در یک عدد بطری سرمی یک لیتری در ورودی هر تراف قرار داده می‌شد تا تخم‌های لقاح یافته به مدت ۵۰ دقیقه در معرض آن قرار بگیرد. تخم‌ها به مدت ۲۰ روز (تا مرحله چشم زدگی) در مواجهه با ترکیبات و مواد ذکر شده قرار گرفتند.

تعیین درصد چشم‌زدگی تخم‌ها

از زمان شروع آزمایش (معرفی تخم‌های لقاح یافته به تراف) تا پایان زمان تیمار (۲۰ روز پس از لقاح و چشم‌زدگی تخم‌ها)، تخم‌های پاره و سفید شده از تخم‌های سالم جدا شد (با سیفون کردن). سپس نسبت به تمیز کردن سینی‌ها و تراف‌ها اقدام شد و دوباره تخم‌ها به همان محل قبلی خود برگردانده شدند تا تخم‌گشایی شوند. در این مرحله درصد چشم‌زدگی تخم‌ها (E) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Arndt et al., 2001).

رابطه ۱:

$$E\,(\%) = [N_E / (N_T - M_i)] \times 100$$

N_E: تعداد تخم‌های چشم زده؛ N_T: تعداد کل تخم‌ها؛ M_i: مرگ و میر ابتدایی.

همچنین تخم‌های مرده از مرحله چشم زدگی به بعد روزانه جمع‌آوری و تعداد آنها ثبت شد. در پایان دوره مجموع تعداد تخم‌های مرده در کل دوره محاسبه و ثبت شد.

تعیین درصد قارچ‌زدگی

تعداد توده‌های قارچ و تعداد تخم‌ها در هر توده به عنوان شاخص شدت آلودگی محاسبه و

ثبت شد و درصد قارچ‌زدگی (F) از طریق رابطه ۲ به دست آمد (Barnes et al., 1998).

رابطه ۲:

$$F\,(\%) = (N_H / N_F) \times 100$$

N_F: تعداد تخم‌های قارچ زده؛ N_T: تعداد کل تخم‌ها.

تعیین درصد تخم‌گشایی

حدود ۳۳ روز پس از لقاح، تخم‌گشایی تخم‌ها صورت گرفت که در این مرحله لاروها دارای کیسه زرده بوده و به صورت پهلو به پهلو درون سینی‌ها به حالت خوابیده قرار گرفته بودند. تعیین درصد تخم‌گشایی از طریق نمونه‌برداری و شمارش لاروهای تخم‌گشایی شده انجام شد و درصد تخم‌گشایی (H) لاروها از رابطه ۳ محاسبه شد (Springate et al., 1984; Geffen and Evans, 2000).

رابطه ۳:

$$H\,(\%) = (N_H / N_E) \times 100$$

N_H: تعداد تخم‌های تخم‌گشایی شده؛ N_E: تعداد تخم‌های چشم زده.

تجزیه و تحلیل آماری

جمع‌آوری و پردازش اطلاعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) انجام گرفت. قبل از تجزیه و تحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از هر مرحله آزمایش با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب

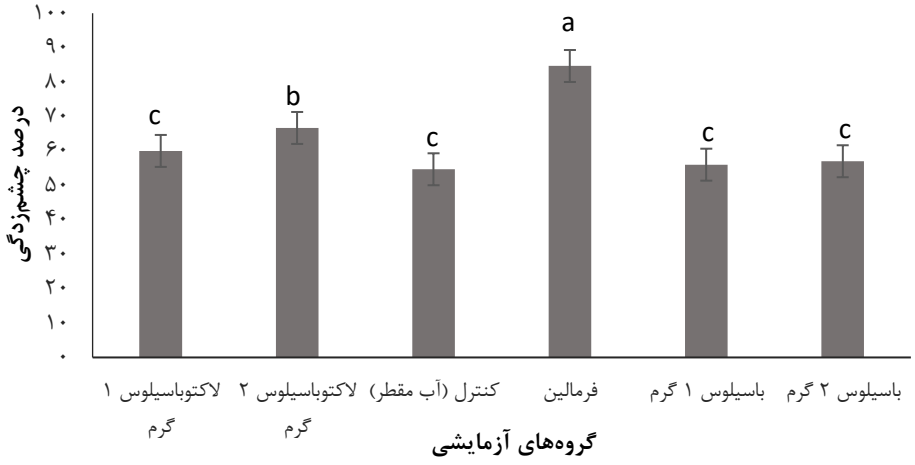
شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب محیط آزمایش در جدول ۲ آورده شده است. کلیه شاخص‌های کیفی آب در دامنه مناسب برای نگه‌داری تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان قرار داشت.

جدول ۲: شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب محیط آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد)

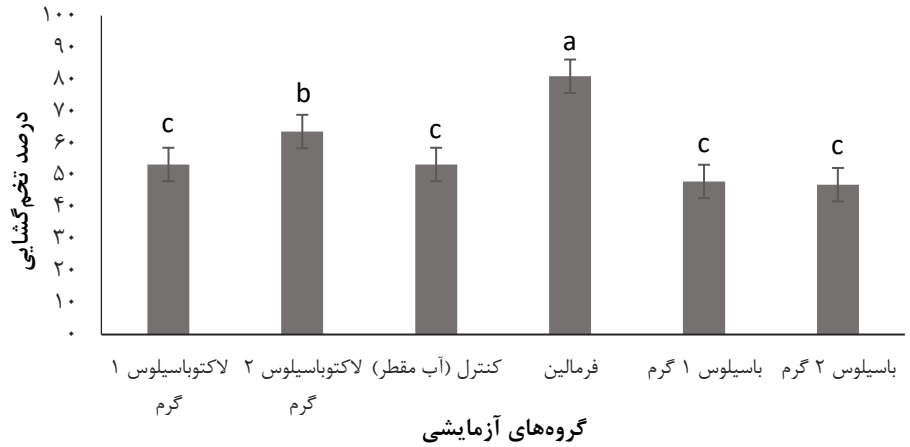
شاخص‌ها	میزان
دما (°C)	۱۱/۵±۰/۷
اکسیژن محلول (mg/L)	۷±۰/۴
pH	۷/۸±۰/۲
سختی کل (mg/L)	۲۵۰±۲۲

درصد چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و قارچ‌زدگی

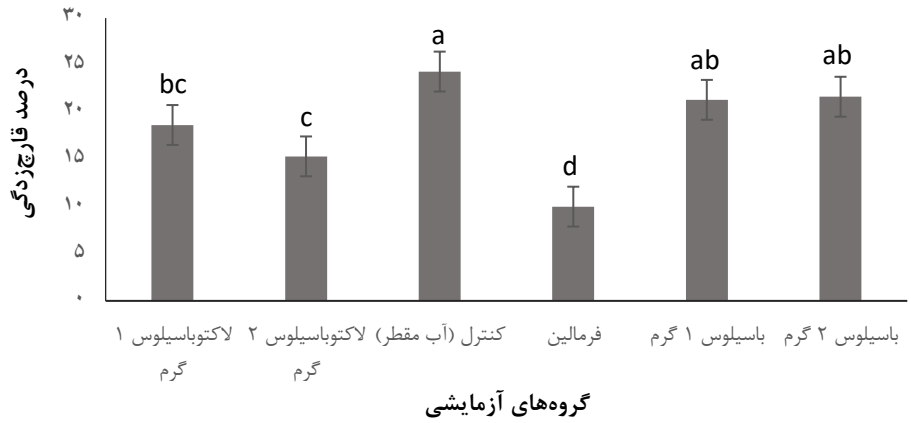
نتایج مربوط به درصد چشم‌زدگی، تخم‌گشایی و درصد قارچ‌زدگی در تیمارهای مختلف آزمایشی در شکل‌های ۱ تا ۳ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، فرمالین با میانگین ۸۴/۶۷±۰/۵۸ درصد بالاترین درصد چشم‌زدگی و گروه شاهد (آب مقطر) با میانگین ۵۴/۶۷±۲/۰۸ درصد پایین‌ترین درصد چشم‌زدگی را در بین تیمارهای آزمایشی داشته است. بالاترین درصد تخم‌گشایی به ترتیب در تیمارهای فرمالین (۱±۸۱/۰۰ درصد) و ۲ گرم *L. plantarum* (۵/۵۱±۶۳/۶۷ درصد) مشاهده شد. همچنین کمترین درصد تخم‌گشایی در تیمار ۶ (۲ گرم *B. subtilis*) به دست آمد. کمترین درصد قارچ‌زدگی در تیمار فرمالین (۱±۱۰ درصد) مشاهده شد و بیشترین درصد قارچ‌زدگی در تیمار شاهد (۲/۰۸±۲۴/۳۳ درصد) مشاهده شد.



شکل ۱: درصد چشم‌زدگی تخم‌های در تیمارهای آزمایشی مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف غیرمشابه در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).



شکل ۲: درصد تخم‌گشایی در تیمارهای آزمایشی مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف غیرمشابه در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).



شکل ۳: درصد قارچ‌زدگی تخم‌ها در تیمارهای آزمایشی مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف غیرمشابه در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به درصد چشم‌زدگی تخم‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف در شکل ۱ آورده شده است. همان طور که مشخص است، گروه آزمایشی ۴ (فرمالین) بیشترین درصد را داشت

که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی داشت (P<۰/۰۵). بین گروه‌های آزمایشی اول (*L. plantarum* ۱ گرم)، سوم (شاهد)، پنجم (*B. subtilis* ۱ گرم) و ششم (*B. subtilis* ۲ گرم) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به درصد تخم‌گشایی در گروه‌های آزمایشی مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار مشخص است، مشابه روندی که درباره درصد چشم‌زدگی مشاهده شد، گروه آزمایشی ۴ (فرمالین) بیشترین درصد را داشت که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و گروه‌های دیگر آزمایشی داشت (P<۰/۰۵). بین گروه‌های آزمایشی اول (*L. plantarum* ۱ گرم)، سوم (شاهد)، پنجم (*B. subtilis* ۱ گرم) و ششم (*B. subtilis* ۲ گرم) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به درصد قارچ‌زدگی تخم‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که در نمودار مشخص است، گروه آزمایشی ۴ (فرمالین) کمترین درصد را داشت که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و گروه‌های دیگر آزمایشی داشت (P<۰/۰۵). بین گروه‌های آزمایشی اول (*L. plantarum* ۱ گرم)، پنجم (*B. subtilis* ۱ گرم) و ششم (*B. subtilis* ۲ گرم) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). گروه شاهد بیشترین درصد قارچ‌زدگی را داشت که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر آزمایشی داشت (P<۰/۰۵).

بحث

قارچ‌زدگی تخم در شرایط تکثیر مصنوعی، یکی از بزرگ‌ترین معضلات در مسیر تولید لارو و بچه ماهی است. حساسیت تخم ماهیان به عفونت‌های قارچی اغلب بستگی به کیفیت آب، طول دوره انکوباسیون، نوع ماهی و میزان تراکم و ساختار تخم دارد (Post, 1983; Kitancharoen and Hatai, 1997; Czeczuga and Muszynska, 1999; Bangyeekhun et al., 2001).

مدیریت بهداشتی نامناسب در کارگاه‌های پرورش و عواملی چون تراکم بالای تخم در مراکز تکثیر و کیفیت فیزیکوشیمیایی متغیر آب مانند تغییرات دمایی و آلودگی آب، خطای کارگر و پیش‌مولدین یا مولدین نارس از عوامل زمینه‌ساز بیماری‌های قارچی در آبزیان به شمار می‌روند (ابراهیم‌زاده موسوی و همکاران، ۱۳۸۶). با توجه به عوارض نامطلوب مواد شیمیایی، مقررات جدی برای محدودیت

استفاده از مواد شیمیایی در آبزی‌پروری ایجاد شده است. بنابراین جستجو و به کار بردن دارویی که ضمن کارایی مطلوب، دارای حداقل اثرات سمی باشد و برای گونه‌های پرورشی نیز دارای حداقل عارضه باشد، همواره در جهت مبارزه با بیماری‌های قارچی از اهمیت بالایی برخوردار است (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴).

تولید لارو ماهیان از نظر کیفیت و کمیت لازمه افزایش تولیدات آبزی‌پروری در مزارع پرورش ماهیان است (Kjorsvik et al., 1990). این امر باعث شده است که حساسیت خاصی به مراحل تولیدمثلی ماهیان مانند رسیدگی جنسی، تخم‌ریزی و دوره رشد و نمو (از مرحله لقاح تا جذب کیسه زرده) در بین آبزی‌پروران ایجاد شود، به طوری که تولید لاروهای با کیفیت بالا منجر به افزایش تولید و سود اقتصادی پرورش‌دهندگان ماهی خواهد شد. محافظت و پیشگیری از عوامل بیماری‌زا، مهم‌ترین، آسوده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جلوگیری از صدمات و ضایعات ناشی از بیماری‌ها در مراکز تکثیر و پرورش است. بنابراین ضروری است که در پژوهش‌های شیلاتی توجه ویژه‌ای به موضوعات بهداشتی در زمینه تولید محصولات سالم و با کیفیت مبذول شود. تخم ماهی می‌تواند برای انتقال بیماری از مولدین به نوزادان و بین مراکز تکثیر به علت احتمال وجود عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب، به عنوان یک ناقل باشد (Atanasov et al., 2011). از نقطه نظر تکنیکی ضدعفونی، استفاده از مواد شیمیایی برای غیرفعال کردن عوامل بیماری‌زا است (Torgersen and Hastein, 1995). وجود میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا مانند آفت‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در آب ورودی کارگاه می‌تواند باعث مرگ و میر شدید تخم‌ها و لاروها شود. در بین این میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، قارچ‌ها و باکتری‌ها بیشترین آسیب را به تخم ماهیان وارد می‌کنند که برای کاهش خسارت در این مرحله معمولا از ضدعفونی کننده نیز به منظور کاهش اثرات زیان‌بار اقتصادی که ناشی از بار آلودگی در سیستم‌های پرورشی است، می‌تواند راهکاری برای ارتقای کیفیت محصولات شیلاتی و بهسازی محیط پرورش آبزیان باشد. به طور کلی استفاده از مواد ضدعفونی برای کاهش مرگ و میر تخم‌ها و توسعه موفقیت‌آمیز پرورش لاروهای دارای کیسه زرده و اولین مرحله غذادهی است.

قارچ *Saprolegnia* از طریق چسبیدن و نفوذ به دیواره سلول‌های مرده و نیز از طریق تخم‌های مرده به تخم سالم سرایت می‌کند

(Wiloughby, 1994). قارچ‌زدگی تخم‌های لقاح یافته قزل‌آلای رنگین‌کمان از مشکلات عمده کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی مناطقی است که از درجه حرارت آب سرد (معمولا ۱۲-۹ درجه سانتی‌گراد) برخوردار هستند. این درجه حرارت مناسب رشد قارچ *Saprolegnia* است. عواملی از جمله گل‌آلود شدن آب پس از بارش باران و برف در فصول پاییز و زمستان که با تکثیر این ماهی‌ها همراه است، به تکثیر و گسترش قارچ‌های *Saprolegnia* در اطراف تخم‌ها کمک می‌کند. از این رو، در یک برنامه مدیریت بهداشتی ضدعفونی روزانه تخم‌ها علیه قارچ *Saprolegnia* از اهمیت فراوانی برخوردار است. ترکیباتی همچون مالاشیت گرین، فرمالین، کلرید سدیم و آب اکسیژنه به فراوانی مورد استفاده تکثیرکنندگان ماهی قرار گرفته است که با درجات مختلف اثراتی را از خود بجا می‌گذارند (Schreier et al., 1996). مالاشیت گرین که به دلیل سرطان‌زایی به تدریج از لیست دارویی بویژه در آبزی‌پروری حذف شده است به مقدار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر در نابودی زئوسپورها و جلوگیری از رشد هیف‌های *Saprolegnia* موثر است (Willoughby and Roberts, 1992).

کلرید سدیم در کنترل عفونت‌های قارچی و بهبود درصد تخم‌گشایی در تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بسیار موثر گزارش شده است (Khodabande and Abtahi, 2006). میزان استفاده ۲۰ گرم در لیتر کلرید سدیم به مدت ۱۵ دقیقه باعث کنترل عفونت قارچی در تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد (اخلاقی و بهاالدینی، ۱۳۹۱). عصاره برگ بادام هندی که ترکیبی ضدباکتریایی (Burapadaja et al., 1994) معرفی شده، توانسته است رشد قارچ‌ها را روی تخم‌های لقاح یافته ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) کاهش دهد (Chitmanat et al., 2005).

Gonzalez-Palacios و همکاران (۲۰۲۰) در طی مطالعه‌ای دریافتند که پروبیوتیک *Pseudomonas fluorescens* با تولید سیدوفور مانع از قارچ‌زدگی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. همچنین آنها هنگام استفاده از دو سویه باکتری *Pseudomonas fluorescens* تحت عنوان LE89 و LE149 به دو صورت تجویز در آب و استفاده در خوراک دریافتند که استفاده از این باکتری در آب از قارچ‌زدگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جلوگیری می‌کند، ولی در زمانی که در خوراک

استفاده شد تاثیر چندانی نداشت (Gonzalez-Palacios et al., 2020).

باکتری *L. plantarum* که به عنوان پروبیوتیک در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت، با تولید ترکیبات ضدقارچی یا به دلیل استقرار در روی تخم و جلوگیری از قرار گرفتن زئوسپورهای قارچ *Saprolegnia* و همچنین ترمیم فلور باکتریایی طبیعی سطح تخم‌های لقاح یافته کمک کرد. باکتری پروبیوتیکی *L. plantarum* بازماندگی تخم‌ها را ۶۳ درصد بهبود بخشید. به نظر می‌رسد این مکانیزم به واسطه تولید متابولیت‌های مهاری علیه قارچ باشد (یعقوبی و همکاران، ۱۳۸۰؛ Kim and Austin, 2006). در آزمایشگاه نیز اثر بازدارندگی رشد قارچ *Saprolegnia parasitica* توسط باکتری *P. fluorescens* در محیط کشت یابارود دکستروز آگار مشخص شد، به طوری که این قارچ در محیط حاوی باکتری پروبیوتیک *P. fluorescens* بخوبی توسعه نمی‌یابد و هیف‌های آن پلیت را پر نمی‌کنند (اخلاقی و بهاالدینی، ۱۳۹۱). یعقوبی و همکاران (۱۳۸۰) نشان دادند که باکتری *P. fluorescens* قادر است رشد *Saprolegnia diclina* نوع ۱ را در شرایط آزمایشگاهی متوقف سازد. آزمایش‌های قبلی توقف رشد *S. parasitica* را زمانی که از باکتری *P. fluorescens* در محیط آزمایشگاهی استفاده شد، نشان داده‌اند (Hatai and Willoughby, 1988). این باکتری جزئی از فلور آب کارگاه پرورش ماهی محسوب می‌شود و استفاده از آن هیچ گونه زیانی برای موجودات زنده در آب و محیط زیست ندارد.

فرمالین از مواد مورد استفاده فراوان به عنوان یک ضدعفونی کننده و ضدقارچ در پرورش ماهی مطرح بوده است که چنانچه در تعیین میزان و استفاده از آن دقت شود به عنوان داروی مفید علیه قارچ *Saprolegnia* به کار می‌رود. مقدار فرمالین موثر علیه قارچ *Saprolegnia* در تخم‌های لقاح یافته ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عنوان شده است (Marking et al., 1994). در این مطالعه فرمالین با مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر توانست ۸۱ درصد بازماندگی را در تخم‌های لقای یافته به دنبال داشته باشد. در پژوهش حاضر نیز اثرات قارچ‌کشی فرمالین و تا حدودی پروبیوتیک *L. plantarum* تایید شد. به طوری که در بین تیمارها کمترین میزان قارچ‌زدگی تخم‌ها (۱۰ درصد) در تیمار فرمالین مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد. لازم به ذکر است که این پژوهش در شرایط

متداول انکوباسیون تخم قزل‌آلا و با استفاده از تراف‌های کالیفرنیایی و جریان آب و شرایط معمول انکوباسیون اجرا شد و در نتیجه مشابه روش درمان معمول تخم در شرایط کاری است. با این حال تعداد تخم‌ها در تراف‌ها به اندازه شرایط جاری انکوباسیون تخم نبود. در این پژوهش در هر تراف تعداد ۵۵۵۰ عدد تخم قرار داشت در حالی که در شرایط معمول حدود ۲۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ عدد است. در نتیجه در این پژوهش فشار و تراکمی که تخم‌ها در شرایط کارگاهی تجربه می‌کنند، در اینجا اعمال نشد. در کل با توجه به جدید بودن موضوع و قابلیت ضدمیکروبی و ضدقارچی *Lactobacillus*ها و *Bacillus*ها که از روش‌های دفع رقابتی عوامل بیماری‌زا، تولید برخی پپتیدهای ضدمیکروبی، قطع کردن ارتباط بین سلولی در میان باکتری‌ها و تحریک سیستم ایمنی بدن میزبان استفاده می‌کنند، احتمالا با مطالعات بیشتر می‌توان به اثرات مثبت این پروبیوتیک‌ها در کنترل قارچی و مدیریت بهداشتی تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان امیدوار بود. لازم به ذکر است که غلظت و طول مدت پیشنهاد شده داروهای مورد بررسی در این پژوهش در شرایط ویژه این آزمایش ارایه شده است و در هر حال برای اطمینان از بی‌خطر بودن تیمارهای درمانی یک آزمایش اولیه قبل از انجام تیمار دارویی در مقیاس وسیع توصیه می‌شود، چرا که داروهای شیمیایی و همچنین پروبیوتیک‌ها را نمی‌توان همیشه با یک معیار به کار برد، زیرا کارایی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکوشیمیایی آب متغیر است.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان و نیز ریاست و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح‌نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و مشارکت‌های فکری و فنی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

ابراهیم‌زاده موسوی ح.، حسینی فرد س.م.، خسروی ع.، سلطانی م. و یوسفیان م. ۱۳۸۶. جداسازی و شناسایی قارچ‌های ساپروفیت از آلودگی قارچی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در مزارع تکثیر استان مازندران. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲(۳): ۱۶۸-۱۶۳.

ابطحی ب.، محمدنظری ر.، رسولی ع. و شفیع‌زاده سماکوش پ. ۱۳۸۴. مقایسه شاخص درمانی داروهای ضدقارچی فرمالین، سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم در تاس‌ماهی ایرانی. فصلنامه پژوهش و سازندگی، ۱(۶۷): ۴۹-۴۲.

اخلاقی م. و بهاالدینی ع.ا. ۱۳۹۱. مقایسه چند روش درمانی برای مبارزه با ساپرولگنیوزیس در تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۲۵(۱): ۲۴-۱۸.

پورامینی م. و حسینی‌فر س.ح. ۱۳۸۶. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. انتشارات موج سبز. ۱۲۰ص.

جعفریان ح. ۱۳۸۵. تاثیر باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در لارو تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در طول دوره پرورش لاروی از طریق غنی‌سازی با آرتمیا اورمیانا (*Artemia urmiana*). رساله دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۳ص.

فروزانفر ع. ۱۳۸۴. تکثیر و پرورش آزادماهیان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۸۴ص.

یعقوبی آ.، یوسفی ج. و مهرابی م. ۱۳۸۰. مهار رشد ساپرولگنیا دیکلینا نوع ۱ جدا شده از تخم ماهیان قزل‌آلا با استفاده از باکتری *P. fluroscence* در شرایط آزمایشگاهی. دوازدهمین گردهمایی جامعه دامپزشکی ایران، تهران. ۲۳۴ص.

Arndt E.R., Wagner, E.J. and Rout ledge M.D. 2001. Reducing or withholding hydrogen peroxide treatment during a critical stage of rainbow trout development: Effects on eyed eggs, hatch, deformities, and fungal control. North American Journal of Aquaculture, 63: 161–166.

Atanasov A., Rusenova N., Staykov Y., Nikolov G., Pavlov A., Stratev D. and Raichev E. 2011. Chemical surface disinfection of funnel type fish egg incubators. Agricultural Science and Technology, 3(3): 281–284.

Bangyeekhun E., Quiniou S.M.A., Bly J.E. and Cerenius K. 2001. Characterization of *Saprolegnia* sp. isolation from channel cat fish. Disease of Aquatic Organisms, 45: 53–59.

Barnes M.E., Ewing D.E., Cordes R.J. and Young G.L. 1998. North American Journal of Aquaculture, 60(1): 67–70.

Boyd C.E. and Massaaut L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquaculture Engineering, 20: 113–132.

Burapadaja S., Tuntiwechwuttikul P. and Bunchoo A. 1994. A constituent with antibacterial action from *Terminalia catappa*. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 18: 42–46.

Chitmanat C., Tongdonmuan K., Khanom P., Pachontis P. and Nunsong W. 2005. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. Acta Horticulturae, 678: 79–82.

Czeczuga B. and Muszynska E. 1999. Aquatic fungi growing on the eggs of 33 Cyprinid taxa (Cyprinidae) in laboratory condition. Journal of Acta Icthyologica et Piscatoria, 24(2): 53–72.

Decamp O., Moriarty D.J. and Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research, 39(4): 334–338.

Defoirdt T., Sorgeloos P. and Bossier P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology, 14(3): 251–258.

Esiobu N., Armenta L. and Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. International Journal of Environmental Health Research, 12: 133–144.

Forneris G., Bellardi S., Palmegiano G.B., Saroglia M., Sicuro B., Gasco L. and Zoccarato I. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. Journal of Aquaculture, 222(1-4): 157–166.

Fuente M., Miranda C. D., Jopia P., Gonzalez-Rocha G., Guiliani N., Sossa K. and Urrutia H. 2015. Growth inhibition of bacterial fish pathogens and quorum-sensing blocking by bacteria recovered from Chilean salmonid farms. Journal of Aquatic Animal Health, 27(2): 112–122.

Geffen A.J. and Evans J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture, 182: 61–72.

Ghiasi M., Zahedi A., Safari R., Aghaei Moghadam A.A. and Binaii M. 2010. Inhibitory effect of bacteria like *Pseudomonas*

anguiliceptica on in vitro *Saprolegnia* sp. growth. 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Iran. P: 62–65.

Gonzalez-Palacios C., Fregeneda-Grandes J. and Aller-Gancedo J. 2020. Possible mechanisms of action of two *Pseudomonas fluorescens* isolates as probiotics on saprolegniosis control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Animals, 10(9): 1–14.

Hatai K. and Willoughby L.G. 1988. Saprolegnia parasitica from rainbow trout inhibited by the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 8: 27–29.

Howe G.E., Gingerich W.H., Dawson V.K. and Olson J.J. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 11: 222–230.

Khodabande S. and Abtahi B. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. Journal of Applied Ichthyology, 22: 54–56.

Kim D.H. and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Journal of Fish and Shellfish Immunology, 21: 513–524.

Kitancharoen N. and Hatai K. 1997. Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. Journal of Aquatic Animal Health, 9(4): 314–316.

Kjorsvik E., Mangor-Jensen A. and Holmefjord I. 1990. Egg quality in fishes. Journal of Advances in Marine Biology, 26: 71–113.

Marking L.L., Raoh J.J. and Schreier T.M. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. Journal of the Progressive Fish Culture, 56: 225–231.

Michael E.T., Amos S.O. and Hussaini L.T. 2014. A review on probiotics application in aquaculture. Fisheries and Aquaculture Journal, 5(4): 1–3 (1000111).

Oliveira S. and Pijoan C. 2004. *Haemophilus parasuis*: New trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology, 99(1): 1–12.

Oplinger R.W. and Wagner E.J. 2013. Control of *Flavobacterium psychrophilum*: Tests of erythromycin, streptomycin, osmotic and thermal shocks, and rapid pH change. Journal of Aquatic Animal Health, 25(1): 1–8.

Pandiyan P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E. G.J., Subaramaniyan K., Manikkam S. and Sadayappan B. 2013. Probiotics in aquaculture.

Journal of Drug Invention Today, 5(1): 55–59.

Post G.W. 1983. Texbook of Fish Health. TFH Publication, USA. 256P.

Pottinger T.G. and Day J.G. 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: Assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Diseases of Aquatic Organisms, 36(2): 29–41.

Salminen S. and Von Wright A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. CRC Press, USA. 656P.

Schreier T.M., Rach J.J. and Howe G.E. 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide and sodium chloride on fungal infected rainbow trout eggs. Journal of Aquaculture, 140: 323–331.

Sekar A. and Packyam M. 2014. Screening, identification and antagonistic activity of halo stable *Bacillus* sp. Mk22 used as probiotic in *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. African Journal of Food Science, 8(1): 48–53.

Springate J.R.C., Bromage N.R., Elliot J.A.K. and Hudson D.L. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Journal of Aquaculture, 43: 313–322.

Tannock G.W. 2004. A special fondness for lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology, 70(6): 89–94.

Tinh N.T., Dierckens K., Sorgeloos P. and Bossier P. 2007. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Journal of Marine Biotechnology (NY), 10(1): 1–12.

Torgersen Y. and Hastein T. 1995. Disinfectioan in aquaculture. Journal of Review Science Technology Office International, 14: 419–434.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology Journal of Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655–671.

Wang Y.B., Tian Z.Q., Yao J.T. and Li W.F. 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Journal of Aquaculture, 277(3-4): 203–207.

Willoughby L.G. and Roberts R.J. 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. Journal of Fish Disease, 15: 1–13.

Wiloughby L.G. 1994. Fungi and Fish Diseases. Pisces Press Sterling, Scotland. 57P.

Woo P.T.R. and Bruno D.W. 2011. Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral Bacterial and Fungal Infections. CAB International Publication, UK. 901P.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 11, No. 1, Spring 2023

Research Paper

The effect of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on fungal control and egg hatching performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Omid Rahmati[1], Saeed Ziaeinejad[2]*, Ali Aberomand[2], Esmaeil Kazemi[3]

DOI: 10.22124/japb.2022.22297.1465
Received: May 2022 Accepted: December 2022

Abstract

In the fish breeding industry, many disinfectants are used to prevent fungal contamination of eggs during the incubation period, including formalin, hydrogen peroxide, potassium permanganate, etc. The purpose of this research was to evaluate the effect of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* in concentration of 1 and 2g (adding to water) in controlling the fungal contamination of rainbow trout eggs during the incubation stage and comparing its effects with formalin and distilled water (control). To conduct this study, 18 Californian troughs were used for 6 treatments with three replicates, and 1850 fertilized rainbow trout eggs were transferred to each trough. After preparing the trays and distributing the eggs, a separate serum was used for each treatment to disinfect the eggs. The duration of complete emptying of each serum was 50 minutes. The results showed that in the treatments containing formalin (10±1%) followed by *L. plantarum* 2 grams (15.33±3.21%), the lowest rate of fungal infection of eggs was observed, which showed a significant difference with other treatments ($P<0.05$). The highest rate of eyed eggs (84.67±0.58 %) and hatched eggs (81±1%) were observed in formalin treatment, which was significantly different from other treatments ($P<0.05$). The results of the present research showed that these probiotic bacteria can partially prevent the growth of fungus *Saprolegnia*. Probably, with more studies, it can be hoped for the positive effects of these probiotics in fungal control and health management in trout breeding centers.

Key words: *Rainbow Trout Eggs,* Saprolegnia, *Probiotics, Fungal Infection*.

1- M.Sc. in Aquatic Reproduction, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.
3- Ph.D. in Fisheries, Fisheries Research Institute of Iran, Yasouj Shahid Motahari Clod-water Fish Genetics and Breeding Research Center, Fisheries Research Institute of Iran, Yasouj, Iran.

*Corresponding Author: zbsaeed@yahoo.com