

تأثیر استفاده از سطوح مختلف باکتری *Pediococcus acidlactici* در جیره غذایی بر میزان بقاء مولدین، تولید سیست و ناپلی، میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی و تعداد کلنی تشکیل شده در دستگاه گوارش آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)

- **شهناز جباری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **محمدرضا ایمانیپور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **وحید تقی‌زاده**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- **امید صفری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد
- **حمیدرضا احمدنیا** مطلق: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۳

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر استفاده از باکتری *Pediococcus acidlactici* بر میزان بقاء مولدین آرتمیا، مقدار سیست و ناپلی تولید شده توسط مولدین هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم‌های سیستم ایمنی بدن و مقدار کلنی باکتریایی پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی تشکیل شده در دستگاه گوارش آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) انجام شد. در این آزمایش از سه سطح ۱۰۲ (تیمار اول)، ۱۰۴ (تیمار دوم)، ۱۰۶ (تیمار سوم) CFU باکتری در هر گرم غذا و تیمار شاهد (بدون پروبیوتیک) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (۴ تیمار هر یک در ۳ تکرار) به صورت روزانه استفاده گردید. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سیست و ناپلی تولید شده توسط مولدین آرتمیا فرانسیسکانا و هم‌چنین میزان بقاء مولدین آرتمیا در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد بود ($p < 0/05$). بیش‌ترین مقدار تولید سیست در تیمار دوم (۲۱۵ عدد) به دست آمد و بیش‌ترین مقدار تولید ناپلی از مولدین آرتمیا در تیمار اول (۱۹۰۹ عدد) بود. در این آزمایش میزان آنزیم‌های ایمنی آرتمیا فرانسیسکانا در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما در تیمار دوم مقادیر آنزیم‌های لیزوزیم (۴/۱۵) واحد بر میکرو گرم پروتئین، فنولوکسیداز (۲/۷۴) و سوپراکسید دیسموتاز ($2/90 \pm 0/82$) واحد بر دقیقه بیش‌ترین مقدار بود در حالی که بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم ایمنی کاتالاز، ۲/۷۹ واحد بر دقیقه در تیمار سوم دیده شد. نتایج حاکی از آن است که تعداد کلنی باکتری پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی تشکیل شده در دستگاه گوارش آرتمیا فرانسیسکانا در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری ($P < 0/05$) نسبت به گروه شاهد داشت. تعداد کلنی باکتری پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی موجود در دستگاه گوارش (CFU در میلی‌لیتر) در تیمار اول، ۷۶۰ CFU بود که بیش‌ترین مقدار را نسبت به گروه شاهد (۵۰۰) نشان داد. با توجه به نتایج ذکر شده از این بررسی مقدار پروبیوتیک برای تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا $CFU 104$ و $CFU 102$ در گرم غذا پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: آرتمیا فرانسیسکانا، *Pediococcus acidlactici*، بقاء مولدین، سیست، ایمنی، تعداد باکتری



مقدمه

مکمل و یا حتی به‌عنوان جایگزینی برای ترکیبات ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرند. مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر آبیان تأثیر می‌گذارند که شامل دفع رقابتی پاتوژن‌ها است، یعنی پروبیوتیک‌ها از طریق آنتی‌بیوزیس یا رقابت برای مواد مغذی و یا جایگاه‌های اتصال تغییر متابولیسم باکتری‌ها و یا با تحریک سیستم ایمنی بدن مانع تشکیل کلونی پاتوژن‌ها در لوله گوارش میزبان می‌شوند (طالبی و همکاران، ۱۳۸۹). پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث کاهش یا حذف بعضی عوامل بیماری‌زا شده و موجب بهبود رشد و بقاء در موجود هدف شوند (Jory، ۱۹۹۸).

پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌دلیل ویژگی آنتاگونیستی یا جلوگیری از تشکیل کلنی باکتری‌های بیماری‌زا، تحریک سیستم ایمنی طبیعی بدن و یا راه‌سازی ترکیبات سودمند برای میزبان مفید باشند (Olafsen، ۲۰۰۱). در تحقیقی دو فعالیت آنزیمی شبه لیزوزیم و شبه تریپسین در سیست آرتمیا تأیید شد در پوسته سیست فقط یکی از پروتئازها وجود داشت، براساس این تحقیق پروتئاز دوم می‌تواند همراه با لیزوزیم، به دفاع شیمیایی در مقابل پاتوژن بپردازد. این اولین گزارش از فعالیت شبه لیزوزیم در سیست آرتمیا و شبه تریپسین در پوسته سیست آرتمیا می‌باشد (Stabilia و همکاران، ۱۹۹۹). استفاده از محرک سیستم ایمنی به‌عنوان مکمل غذایی می‌تواند به بهبود دفاع ذاتی حیوانات در برابر عوامل بیماری‌زا، دوران استرس بالا، درجه‌بندی، تولیدمثل، انتقال دریایی و واکسیناسیون منجر شود (Ian Bricknell و همکاران، ۲۰۰۵). در کشور ما، آرتمیا و سیست آن در پرورش میگو که در مناطق جنوبی کشور توسعه یافته، مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌چنین استفاده از آرتمیا در پرورش ماهیان خاویاری و قزل‌آلا که جزء ماهی‌های با ارزش محسوب می‌شود نتایج بسیار خوبی در برداشته است لذا پرورش آرتمیا و تولید سیست آن می‌تواند کمک شایانی به صنعت آبی پروری در کشور بنماید.

مواد و روش‌ها

پروبیوتیک مورد استفاده باکتوسل (Bactocell®، France) حاوی 10^{11} کلنی در گرم (CFU/gr) باکتری پدیوکوکوس/اسیدی لاکتیکی^۱ می‌باشد. باکتوسل یک پروبیوتیک است که قادر به تولید اسیدلاکتیک می‌باشد. ترکیب این پروبیوتیک تجاری

مهم‌ترین کاربرد آرتمیا مربوط به صنعت آبی‌پروری می‌باشد. امروزه آرتمیا به‌عنوان بهترین ماده غذایی برای پرورش میگو، ماهی‌های دریایی، آب شیرین و زینتی شناخته شده است. شاید مهم‌ترین علل در این مورد، ارزش غذایی آن باشد. آرتمیا موجودی است که می‌توان آن را با توجه به نیاز آبی پروری در مراحل مختلف زندگی مورد استفاده قرار داد. آرتمیا از نظر تغذیه‌ای، فیلترکننده غیرانتخابی است، بدین معنا که از کلبه مواد غذایی موجود در محیط که از نظر اندازه قابلیت ورود به دهان را داشته باشند، می‌تواند استفاده نماید (حافظیه، ۱۳۸۵). آرتمیا همانند یک غذای عالی برای لاروهای تازه هج شده ماهی می‌باشد در نتیجه، آبی‌پروری در سال ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ با استفاده از آرتمیا به‌عنوان غذایی با ارزش غذایی بالا توسعه یافت (Bengtson و همکاران، ۱۹۹۱). هم‌چنین آرتمیا یکی از مهم‌ترین غذاهای زنده در آبی‌پروری می‌باشد که با داشتن ویژگی‌هایی مانند پرورش آسان، قابلیت دسترسی و نگهداری آن به‌مدت طولانی و قابلیت حمل انواع ویتامین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها (Sorgeloos و همکاران، ۱۹۸۶) به‌صورت گسترده‌ای در آبی‌پروری نقش دارد. مطالعات زیادی در زمینه اثرات باکتریای گوناگون بر شاخص‌های زیستی آرتمیا *فرانسیسکانا* انجام شده است (Marques، ۲۰۰۶؛ Orozco Medina، ۲۰۰۲؛ Verschuerه، ۱۹۹۹). ایده استفاده از پروبیوتیک در یک دید وسیع را Moriarty (۱۹۹۷) پیشنهاد کرد که پروبیوتیک‌ها به‌عنوان افزودنی‌های آبی نیز تعریف شوند. در تحقیقی اثر ۶ گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیکی به‌عنوان پروبیوتیک روی ناپلی آرتمیا بررسی شد. هدف از این آزمایش سنجش میزان مقاومت ناپلی آرتمیا در برابر گونه *Vibrio alginolyticus* بود. نتایج نشان داد که در نهایت گونه باکتری *Lactobacillus casei* به‌عنوان پروبیوتیکی که توانایی چسبندگی بیش‌تر در دستگاه گوارش و تشکیل کلنی وسیع دارد، انتخاب شد که موجب بیش‌ترین رشد آرتمیا با پاتوژن یا بدون پاتوژن گردید (Faouzi Lamari و همکاران، ۲۰۱۴). در اوایل قرن بیستم جایگزینی باکتری‌های اسیدلاکتیک در داخل روده انسان به‌علت متوقف کردن فعالیت سایر میکروب‌های زیان‌آور پیشنهاد داده شد، هم‌چنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث کاهش یا حذف بعضی عوامل بیماری‌زا شده و موجب بهبود رشد و بقاء در موجود هدف شوند (Jory، ۱۹۹۸). در آبی‌پروری پروبیوتیک‌ها به‌منظور کنترل بیماری‌ها، به‌صورت

¹ *Pediococcus acidilactici*



آرتمیا فرانسیسکانا، غذادهی، بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب، بقای مولدین، تعداد ناپلی و تعداد سیست و غیره به صورت پیش آزمایش انجام گردید.

جهت اجرای آزمایش اصلی ۱۲ عدد مخزن ۶۰ لیتری آماده گردید که با ۴۰ لیتر آب آبیگری شد. مقدار ۵ گرم سیست آرتمیا فرانسیسکانا به ظروف مخروطی با حجم آب ۱ لیتر جهت تفریخ ریخته شد. شرایط فیزیکی و شیمیایی آب محیط تفریخ و پرورش طبق استانداردهای اعلام شده در نظر گرفته شد (جدول ۱). خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه کنترل و ثبت می گردید.

شامل اسپورهای فعال باکتری‌های مذکور به میزان حداقل 10^{10} واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم می باشد که در این آزمایش به عنوان باکتری‌های هدف در نظر گرفته شده است. در این آزمایش از سه سطح 1×10^2 (تیمار اول)، 1×10^4 (تیمار دوم)، 1×10^6 (تیمار سوم) باکتری به ازاء هر گرم غذا و تیمار شاهد (بدون پروبیوتیک) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به صورت ۴ تیمار و هر یک در ۳ تکرار انجام شد. آزمایش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه شیلات دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. قبل از انجام آزمایش اصلی تمام مراحل موجود در آزمایش از جمله تفریخ سیست‌های

جدول ۱: شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب محیط (انحراف معیار \pm میانگین) تفریخ سیست و پرورش آرتمیا فرانسیسکانا

محیط	شوری (گرم بر لیتر)	اکسیژن محلول (میلی گرم بر لیتر)	دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	pH	روشنایی (لوکس)
تفریخ	۳۵	$2 \pm 2/5$	2 ± 28	$8 \pm 0/3$	۲۰۰۰
پرورش	۶۰	2 ± 5	2 ± 23	$8 \pm 0/3$	۱۰۰۰

(Neisse و همکاران، ۲۰۱۳). فعالیت Phenoloxidase (PO) با روش اسپکتروفتومتری با ثبت تشکیل dopachrome از dihydroxyphenylalanine-L (DOPA-L)، با توجه به روش ارائه شده توسط (Hernandez-Lopez و همکاران ۱۹۹۶) مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم Superoxide dismutase (SOD) با رعایت جلوگیری از کاهش C ferricytochrome و در آخر خواندن ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Cooper و همکاران، ۲۰۰۲). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در دو نسخه با استفاده از روش (Cohen و همکاران ۱۹۷۰) با برخی تغییرات سنجش شد. میزان کلنی تشکیل شده باکتری پدیوکوکوس/اسیدی لاکتیکی در دستگاه گوارش آرتمیا فرانسیسکانا نیز انجام شد زی توده آرتمیا بعد از جمع‌آوری توسط آب شیرین شسته و آبیگری گردید. مقداری از نمونه‌ها درون فویل‌های آلومینیم گذاشته شده و فریز شد و جهت سنجش آنزیمی به آزمایشگاه منتقل گردید. برای سنجش تعداد کلنی پدیوکوکوس/اسیدی لاکتیکی نمونه آرتمیا به صورت زنده به پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی انتقال داده شد.

تمام داده‌ها توسط نرم‌افزار Excel پردازش گردید. مقادیر مربوط به داده‌های درصدی، به Arcsin تبدیل شدند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. تعیین اختلاف میانگین چنددانه دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد و آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS انجام گردید.

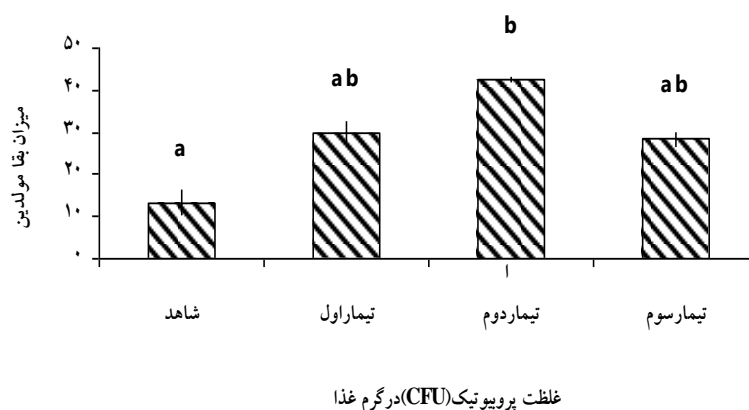
جهت تغذیه ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا از مخمر نانویی استفاده گردید (Sorgeloos و Lavens، ۱۹۹۶). غذای آرتمیا مخمر بود که داخل آب با شوری ۳۵ گرم در لیتر آب ۲۸ درجه حل شد (احمدنیا مطلق و همکاران، ۱۳۹۱) پروبیوتیک باکتوسل به صورت روزانه توسط ترازوی دیجیتالی حساس در شرایط استریل وزن شده و با سطوح گفته شده آماده گردید. در روز اول، ۲ گرم مخمر داخل آب ریخته شد و همراه با ۰/۵ سی‌سی از سطوح مختلف محلول پروبیوتیکی کاملاً مخلوط و به تانک‌ها داده شد و گروه شاهد غذای بدون پروبیوتیک دریافت کرد عمل غذادهی و پرورش تا روز ۲۸ پرورش ادامه داشت مقدار غذا در روز آخر ۳۰ گرم برای کل تانک‌ها بود و مقدار پروبیوتیک ۶ سی‌سی از سطوح مختلف پروبیوتیک برای هر تانک استفاده شد. هر روز نمونه‌برداری از داخل تانک‌ها انجام و تعداد ناپلی‌ها شمارش می‌شد. دمای تانک‌ها و نیز دمای سالن پرورش هر روز ثبت می‌گردید. در روز آخر آزمایش ۱۰ جفت مولد از هر تیمار به ۱۲ بشر که حاوی ۰/۵ لیتر آب با شرایط استاندارد بود منتقل شد و هر روز تعداد ناپلی‌ها و سیست‌های تولید شده توسط مولدین شمارش می‌گردید. هم‌چنین روزانه تعداد تلفات مولدین نیز شمارش و ثبت می‌گردید. نمونه‌برداری به منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی بدن انجام شد فعالیت لیزوزیم براساس لیزیز از حساسیت لیزوزیم باکتری گرم مثبت میکروکوکوس دکتیکوس تعیین شده است



نتایج

میزان بقاء در تیماردوم (۴۲/۵٪) مشاهده شد نتایج نشان داد که در طول دوره پرورش اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد وجود داشت ($P < 0.05$).

نتایج به‌دست آمده از تأثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر میزان بقاء مولدین آرتمیا فرانسيسکاتا در شکل ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین

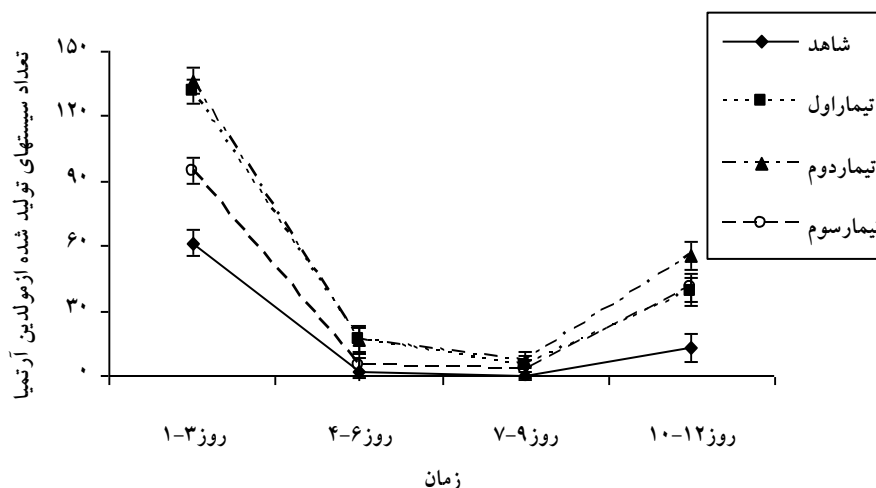


شکل ۱: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان بقاء مولدین آرتمیا فرانسيسکاتا تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (۱۰۲، ۱۰۴ و ۱۰۶ CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$)

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

بود. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). اما تیمارهای اول و سوم علی‌رغم تولید سیست بیش‌تر اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان ندادند.

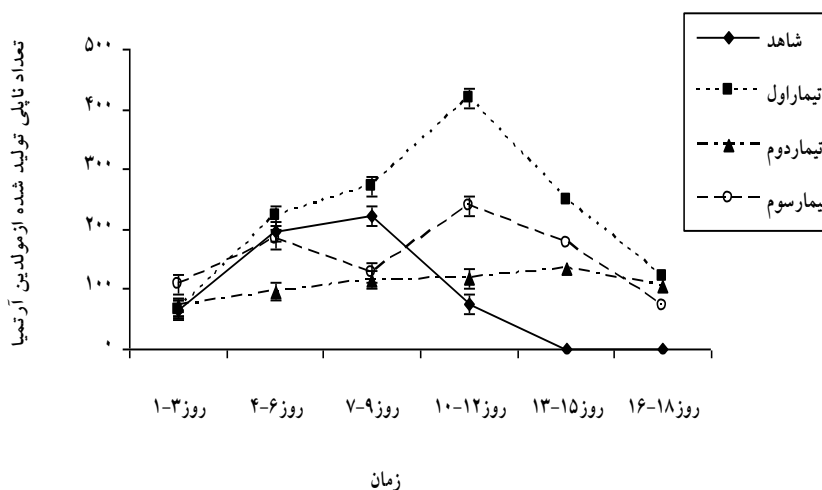
تأثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر مقدار سیست‌های تولیدشده توسط مولدین آرتمیا فرانسيسکاتا در شکل ۲ دیده می‌شود بیش‌ترین مقدار کل تولید سیست (۲۱۵ عدد) مربوط به تیمار دوم (10^4 CFU در گرم غذا)



شکل ۲: نمودار میانگین (± انحراف معیار) تعداد سیست حاصل از مولدین آرتمیا فرانسيسکاتا تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (۱۰۲، ۱۰۴ و ۱۰۶ CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$)

مقدار تولید ناپلی را داشت و اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد را نشان داد ($P < 0.05$). اما تیمارهای دوم و سوم با این که مقدار تولید ناپلی آن‌ها نسبت گروه شاهد بیش تر بود ولی اختلاف معنی داری را نشان ندادند.

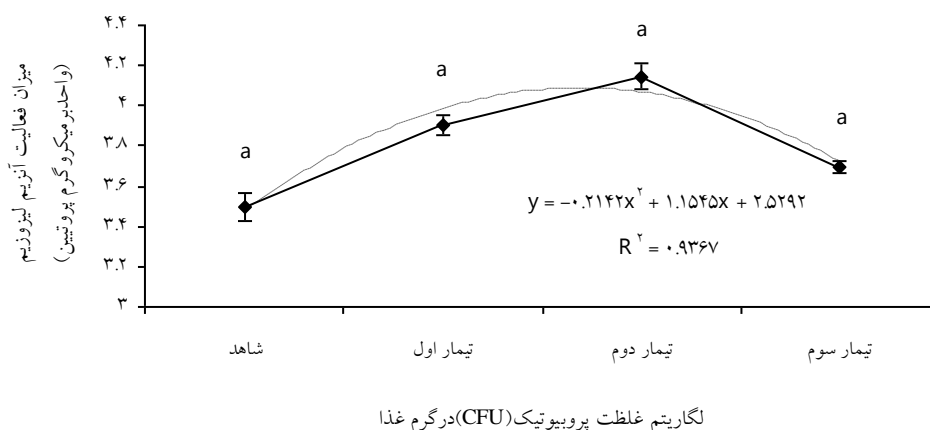
نتایج به دست آمده از تاثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر مقدار ناپلی تولید شده توسط مولدین آرتمیا فرانسیسکانا در شکل ۳ دیده می شود. در این ارتباط تعداد کل ناپلی تولید شده توسط آرتمیای تغذیه شده با 10^2 CFU در گرم غذا، ۱۹۰۹ عدد بود که بیش ترین



شکل ۳: نمودار میانگین (\pm انحراف معیار) تعداد ناپلی حاصل از مولدین آرتمیا فرانسیسکانا تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 ، 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$)

آزمایشی اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P < 0.05$). نتایج نشان داد میزان لیزوزیم با زیاد شدن مقدار پروبیوتیک استفاده شده در غذای آرتمیا افزایش یافت و در تیمار سوم کاهش پیدا کرد (شکل ۴).

نتایج حاصل از تاثیر استفاده از سطوح مختلف باکتری *Pediococcus acidilactici* بر میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی بدن آرتمیا فرانسیسکانا در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم ایمنی لیزوزیم در تیمارهای



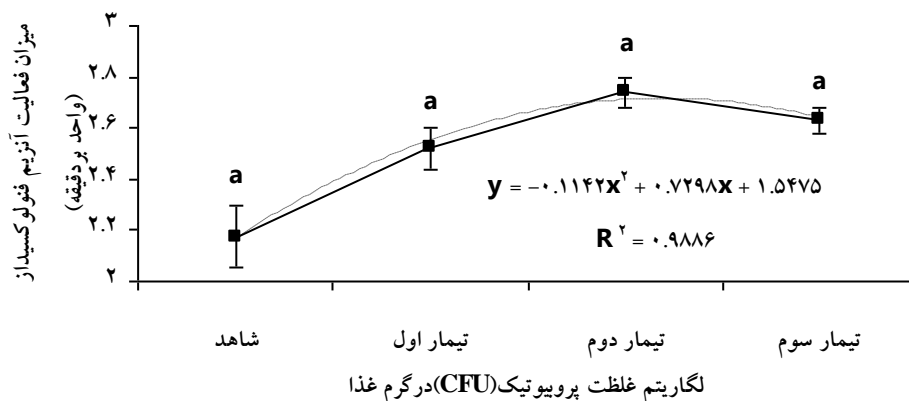
شکل ۴: نمودار میانگین (\pm انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم حاصل از پرورش آرتمیای فرانسیسکانا تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 ، 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$).

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.



آنزیم فنولوکسیداز در تیمار دوم مشاهده گشت که با اضافه شدن پروبیوتیک در تیمار سوم مقدار آن کاهش یافت (شکل ۵).

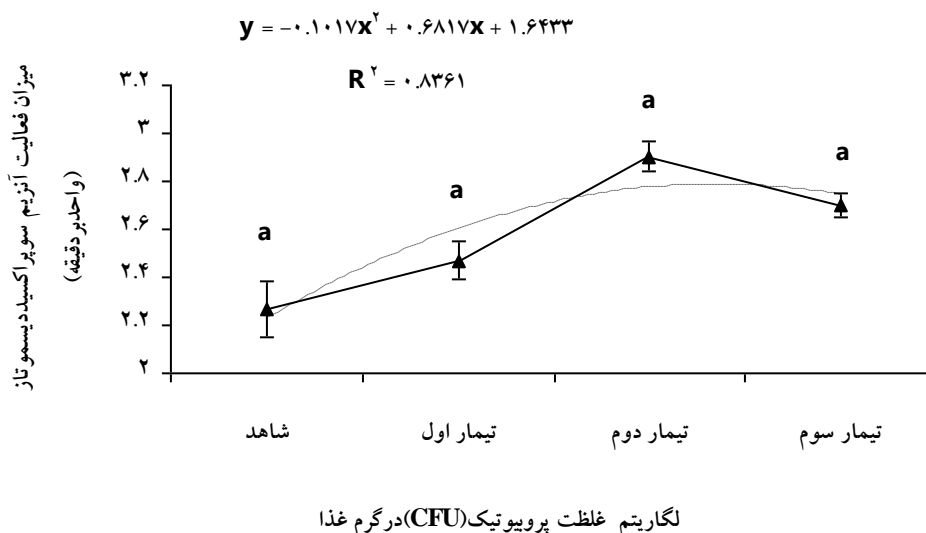
میزان فعالیت آنزیم ایمنی فنولوکسیداز (Phenoloxidase) در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت ($P < 0.05$). براساس نتایج این بررسی بیشترین مقدار



شکل ۵: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم فنولوکسیداز حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 ، 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$). حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

شاهد نداشت ($P < 0.05$). میزان فعالیت آنزیم SOD با افزایش مقدار پروبیوتیک زیاد شده و در تیمار سوم کاهش می‌یابد (شکل ۶).

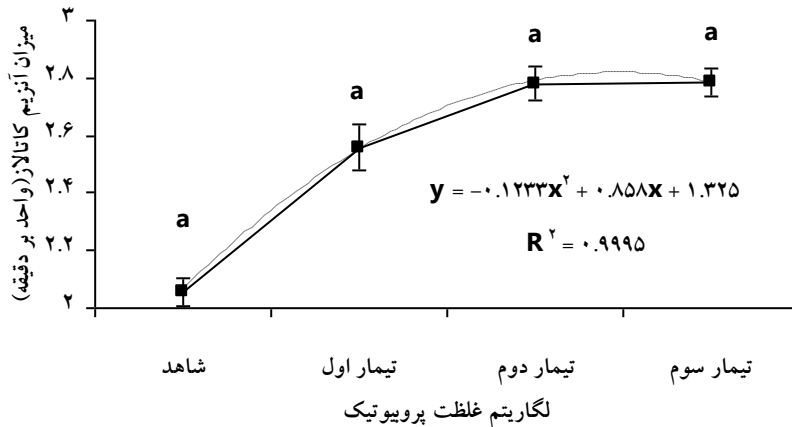
میزان فعالیت آنزیم ایمنی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) Superoxide dismutase این مطالعه در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری با گروه



شکل ۶: میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 ، 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$). حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میزان فعالیت کاتالاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت داد (شکل ۷).

میزان فعالیت آنزیم ایمنی کاتالاز در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میزان فعالیت کاتالاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت

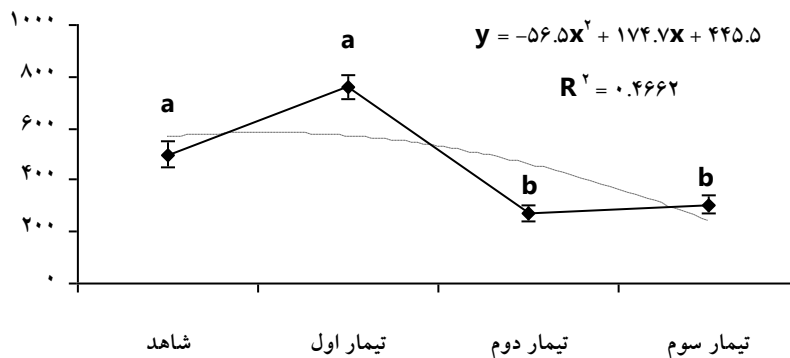


شکل ۷: نمودار میانگین (\pm انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 , 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$).

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند ($P < 0.05$). بیش‌ترین مقدار کلنی در تیمار اول شمارش شد.

شمارش کلنی باکتری پدیوکوکوس/اسیدی لاکتیکی تشکیل شده در محیط اختصاصی MRS در شکل ۸ نشان داده شده است. تعداد کلنی تشکیل شده در تیمارهای آزمایشی اختلاف



شکل ۸: نمودار میانگین (\pm انحراف معیار) تعداد کلنی MRS حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (10^2 , 10^4 و 10^6 CFU در گرم غذا) در سه تکرار ($P < 0.05$).

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



بحث

باکتری‌های مفید یا زیست‌یار موجب بهینه‌سازی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب افزایش کارایی بهره‌برداری از آب و همچنین ارتقاء عملکرد رشد آبزیان می‌شود. کنترل میکروبی و معرفی سویه‌های مفید باکتری‌ها در افزایش سازگاری اکولوژیکی، بقاء و عملکرد رشد ماهیان مفید بوده و می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد مهم در ارتقاء و توسعه پایدار آبی‌پروری کشور و استفاده مفید از منابع آبی پیشنهاد گردد (جعفریان، ۱۳۸۷).

استفاده از باکتری‌های مفید در محیط پرورش آرتمیا موجب افزایش درصد بقاء نسبت به پرورش آرتمیا در شرایط استریل گردید (Verschuere و همکاران، ۱۹۹۹). در این بررسی افزودن پروبیوتیک پدیوکوکوس/سیدلاکتیکی به محیط پرورش مولدین آرتمیا فرانسيسکانا باعث به‌وجود آمدن یک محیط پایدار شده و درصد بقاء مولدین را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است. با افزودن باکتری‌ها به محیط پرورش آرتمیا دیده شده است که برخی گونه‌های باکتریایی سرعت رشد و میزان بقاء آرتمیا را می‌توانند افزایش دهند (Verschuere، ۱۹۹۹).

پروبیوتیک پدیوکوکوس/سیدی لاکتیکی با تغییر بر تعادل میکروبی دستگاه گوارش آرتمیا باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شده و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب افزایش رشد می‌شود. بیش‌ترین میزان درصد بقاء مولدین آرتمیا فرانسيسکانا در تیمار دوم (۱۰^۴ CFU در گرم غذا) مشاهده گردید. به‌نظر می‌رسد وجود اختلاف معنی‌دار در تولید سیست به‌دلیل تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس/سیدی لاکتیکی در باروری بیش‌تر مولدین آرتمیا فرانسيسکانا بوده است که می‌تواند ناشی از بهبود یافتن شرایط محیطی افزایش بقاء و پاسخ‌های ایمنی مولدین باشد که توانایی تولید سیست بیش‌تر در نتیجه اضافه کردن مقدار بیش‌تر پروبیوتیک در محیط را داشته باشد. استفاده از پروبیوتیک‌ها برای لارو دوکفه‌ای‌ها سبب بهبود معنی‌داری در زنده‌مانی آن‌ها گردید (Gibson و همکاران، ۱۹۹۸).

در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی لیزوزیم، فنولوکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($P < 0.05$). با افزایش مقدار پروبیوتیک ترشح آنزیم‌های لیزوزیم، فنولوکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز بیش‌تر شده و در تیمار سوم مقدار آن‌ها کاهش یافت. فعالیت آنزیم ایمنی کاتالاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان نداد ($P < 0.05$).

در رابطه با تاثیر پروبیوتیک بر میزان فعالیت‌های آنزیم ایمنی آرتمیا تحقیقات بسیار کمی انجام شده است. در این آزمایش مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز با افزودن پروبیوتیک افزایش یافت و در تیمار سوم بیش‌ترین مقدار فعالیت را نشان داد. در تحقیقی مکمل‌سازی غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با نانو ذرات آهن و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* نشان داد که می‌تواند اثرات معنی‌داری بر پاسخ ایمنی هومورال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بگذارد (توکمه‌چی و ناصح‌محمدی، ۱۳۹۳). تعداد کلنی باکتری پدیوکوکوس/سیدلاکتیکی تشکیل شده در محیط اختصاصی MRS در تیمار ۱ بیش‌ترین و در تیمار ۲ کم‌ترین مقدار بود، پیشنهاد می‌شود بهترین حالت برای استفاده از پروبیوتیک مقدار ۱۰^۱ CFU در گرم غذا می‌باشد، به‌نظر می‌رسد یک حالت رقابتی بین کل باکتری‌های دستگاه گوارش و باکتری پدیوکوکوس/سیدلاکتیکی در این تیمار وجود داشته باشد که در این بین باکتری پدیوکوکوس موفق به جایگزینی بیش‌تر نسبت به دیگر باکتری‌ها شده است. افزودن پروبیوتیک تجاری حاوی *Bacillus sp.* به جیره غذایی میگو پرورشی موجب کاهش مرگ و میر و افزایش جذب مواد غذایی شد. همچنین جمعیت باکتریایی بیماری‌زا *Staphylococcus Escherichia coli aureus* و *Clostridium sp.* در دستگاه گوارش میگو کاهش یافت (Moriarty، ۱۹۹۸).

تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های زیست‌یار در آبی‌پروری صورت گرفته و برخی از عملکردهای اثبات شده در خصوص این باکتری‌ها شامل دفع رقابتی برای سایر باکتری‌ها و همین‌طور بازدارنده‌های پروبیوتیکی برای جلوگیری از کلنی شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده، رشد دیگر باکتری‌ها و یا رقابت برای غذا و مکان و تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان ذکر کرد (Austin، ۲۰۰۲).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان‌دهنده آن است که باکتری پدیوکوکوس/سیدی لاکتیکی می‌تواند اثرات مطلوبی در تولید سیست و ناپلی هم‌چنین بقاء مولدین آرتمیا فرانسيسکانا داشته باشد در این تحقیق بیش‌ترین میزان بقاء مولدین هم‌چنین بیش‌ترین مقدار سیست تولید شده در تیمار دوم با سطح ۱×۱۰^۴ CFU باکتری در گرم غذا به‌دست آمد که به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود. مقدار ناپلی تولید شده در تیمار اول با سطح ۱×۱۰^۲ CFU باکتری در گرم غذا به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های آزمایشی بود. میزان



- س.ی.، ۱۳۸۹. اثرات سطوح مختلف سین بیوتیک Biomin IMBO بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان سفید. مجله علمی شیلات ایران. سال ۴، شماره ۳، صفحات ۱۴۲ تا ۱۶۰.
8. **Bengtson, D.; Leger, P.H. and Sorgeloos, P., 1991.** Use of artemia as a food source for aquaculture. *Artemia Biology*. Vol. 11, pp: 255-285
 9. **Cohen, G.; Dembiec, D. and Marcus, J., 1970.** Measurement of catalase activity in tissue extracts, and *Biochem. Anal Biochem*. Vol. 24, pp: 30-38.
 10. **Cooper, R.U.; Clough, L.M.; Farwell, M.A. and West, T.L., 2002.** Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish (*Leiostomus xanthurus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 279, pp: 1-20.
 11. **Hernandez-Lopez, J.; Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F., 1996.** Activation of the Prophenoloxidase system of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 113, pp: 61- 66.
 12. **Ian Bricknell, A.; Roy, A. and Dalmo, b., 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 19, pp: 457-472.
 13. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotic in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. Vol. 25, pp: 1-10.
 14. **Jory, D.E., 1998** Use of probiotics in Penaeid shrimp growth. *Aquaculture Management*. Vol. 24, pp: 62-67.
 15. **Lamari, F.; Sadok, K.; Bakhrouf, A. and Gatesoupe, F., 2014.** Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on Artemia naup. *Aquaculture International*. Vol. 22, pp: 699-709.
 16. **Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. University of Ghent. Ghent, Belgium. 295 p.
 17. **Marques, A.; Huynh Thanh, T.; Verstraete, W.; Dhont, J. and Sorgeloos, P., 2006.** Bossier, yeast to protect gnotobiotic Artemia against different pathogens. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 334, pp: 20-30.
 18. **Moriarty, D.J.W., 1997a.** The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. Vol. 151, pp: 333-349.
 19. **Moriarty, D.J.W., 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in Penaeid ponds. *Aquaculture*. Vol. 164, pp: 351-358.
 20. **Moriarty, D.J.W., 1997b.** Probiotics and biotechnology for sustainable aquaculture, In Nambiar, K.P.P. and Singh, T. (Eds) *Sustainable Aquaculture, INFOFISH*, Kuala Lumpur, Malaysia. pp.115-121.
 21. **Neissi, A.; Rafiee, G.H.; Nematollahi, M.A. and Safari, O., 2013.** The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 35, pp: 1976-1980.
 22. **Olafsen, J.A., 2001.** Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*. Vol. 200, pp: 223-247.
 23. **Orozco-Medina, C.; Maeda-Martinez, A.M. and Lopez-Cortes, A., 2002.** Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and growth. *Aquaculture*. Vol. 213, pp: 15-29.
- فعالیت آنزیم‌های ایمنی در تیمار دوم با سطح 1×10^4 CFU نسبت به سایر تیمارها رشد بیش‌تری داشت ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت.
- تعداد کلنی تشکیل شده باکتری در دستگاه گوارش آرتمیا در تیمار اول با سطح 1×10^2 CFU بیش‌ترین مقدار بوده و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. با توجه به نتایج ذکر شده در این بررسی توصیه می‌گردد پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی با سطح 1×10^2 CFU و سطح 1×10^4 CFU در گرم غذا برای آرتمیا/فرانسسکانا نتایج مطلوب‌تری خواهد داد.

منابع

۱. احمدنای‌مطلق، ح.ر؛ فرهنگی، م.؛ رفیعی، غ.ر. و فضلی، پ.، ۱۳۹۱. تأثیر استفاده از سطوح مختلف مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد و بقاء در آرتمیا ارومیا. نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۵، شماره ۲، صفحات ۹۹ تا ۱۰۸.
۲. احمدنای‌مطلق، ح.ر؛ فرهنگی، م.؛ رفیعی، غ.ر. و نوری، ف.، ۱۳۹۱. تأثیر استفاده از سطوح مختلف باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، ترکیب لاشه و بقاء در آرتمیا ارومیا. نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۵، شماره ۴، صفحات ۳۵۳ تا ۳۶۴.
۳. توکمه‌چی، ا. و محمدی، ن.، ۱۳۹۳. افزایش ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و نانو ذرات آهن. دومین کنفرانس ماهی شناسی ایران. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. صفحات ۱۱ تا ۲۱.
۴. حافظیه، م.، ۱۳۸۵. بررسی اثر تغذیه‌ای کلرلا و کیتوسروس بر نرخ رشد طولی و بازماندگی آرتمیا ارومیا. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۳. صفحات ۵۵ تا ۶۰.
۵. جعفریان، ح.، ۱۳۸۷. توسعه آبی‌پروری پایدار با استفاده از پروبیوتیک‌ها در ایران. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲، شماره ۴، صفحات ۴۷ تا ۵۶.
۶. سوداگر، م.؛ میقائی، ح.؛ ایمان‌پور، م.ر. و شعبانی، ع.، ۱۳۸۹. بررسی اثر پروبیوتیک اپتیمون (آسکوژن یا وانازن) بر شاخص‌های رشد و بازماندگی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، اولین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فراویژه. تهران. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۷. طالبی‌حقیقی، د.؛ فلاحی‌کپورچالی، م. و عبدالله‌نبار،



24. **Stabilia, L.; Miglietta, A.M. and Belmonte, G., 1999.** Lysozyme-like and trypsin-like activities in the cysts of *Artemia franciscana* Kellog, 1906. Is there a passive immunity in a resting stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 237, pp: 291-303.
25. **Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Leger, P.; Tackaert, W. and Versichele, D., 1986.** Manual for the culture and use of brine shrimp artemia in aquaculture. State University of Ghent, Belgium. Belg. 319 p.
26. **Verschuere, L.; Rombaut, G.; Huys, G.; Dhont, J.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 1999.** Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, pp: 2527-2533.

