تأثیر تغذیه با ناپلیوس آرتمیای استرس‌دیده و ریشه کاسنی (*Cichorium intybus*) بر شاخص‌های رشد و زیست‌سنجی گوپی (*Poecilia reticulate*)

- **هاله خلیل‌پور**: گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، کدپستی: ٥٧١٤٩٤٤٥١٤
- **رامین مناف‌فر***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، کدپستی: ٥٧٥٦١٥١٨١٨
- **وحید افشارهزارخانی**: گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، کدپستی: ٥٧١٤٩٤٤٥١٤
- **مهران حبیبی‌رضایی**: گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، صندوق‌پستی: ١٤١٧٦١٤٤١٨
- **علی‌اکبر موسوی‌موحدی**: گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، صندوق‌پستی: ١٤١٧٦١٤٤١٨

تاریخ دریافت: شهریور ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٥

چکیده

ناپلیوس آرتمیا نه‌تنها یک غذای مفید با ارزش غذایی بالا برای دوران لاروی اغلب آبزیان می‌باشد بلکه می‌تواند به‌عنوان حامل بسیاری از افزودنی‌ها نیز مطرح باشد. ایجاد استرس کنترل‌شده در ناپلیوس آرتمیا می‌تواند موجب تحریک و تولید پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) شود که تغذیه با آن باعث رشد و بقاء بهتر موجود شود. در این تحقیق تأثیر تغذیه با ناپلیوس آرتمیای بدون استرس و استرس‌دیده و ریشه کاسنی به‌عنوان یک ماده پری‌بیوتیک در کنار غذای کنسانتره (تیمار شاهد) درمجموع ٧ تیمار، بر شاخص‌های رشد و شاخص‌های زیست‌سنجی بچه ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*) بررسی شد. تعداد ٥١ ماهی در هر تیمار با اندازه تقریباً یکسان، به‌صورت کاملاً تصادفی در ظروف ٣ لیتری تیماربندی و به‌مدت ٣٥ روز در ٣ وعده به‌میزان ٩٪ وزن بدن غذادهی شدند. در ابتدا و انتهای دوره غذادهی ماهی‌ها زیست‌سنجی شدند و نتایج آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج تمامی شاخص‌های مورد مطالعه هم‌چون افزایش وزن، افزایش طول، ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی و درصد افزایش وزن نشان داد که تغذیه با ناپلیوس آرتمیای استرس‌دیده تأثیر بهتری در اعلب فاکتورها داشته است. شاخص‌های ذکر شده به‌جز ضریب چاقی در تیمارهای تغذیه شده با ناپلی افزایش بیش‌تری داشتند ($P<0/05$). تیمارهای کاسنی و شاهد تغذیه‌شده با غذای کنسانتره نتوانستند رقابتی با دیگر تیمارهای تغذیه‌شده با غذای زنده داشته باشند ($P>0/05$).

کلمات کلیدی: آرتمیا، پروتئین‌های شوک حرارتی، کاسنی، گوپی، رشد، ناپلیوس

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Raminmanaffar@gmail.com

مقدمه

آبزی‌پروری طی دهه‌های اخیر پیشرفت زیادی داشته به‌طوری‌که نرخ رشد سالانه آن بیش‌تر از سایر صنایع بوده است (FAO، ۲۰۱۴). اهمیت اقتصادی ماهیان زینتی باعث افزایش چشمگیر تکثیر و پرورش آن‌ها شده است (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین شناخت و تقویت ویژگی‌های مختلف ماهیان آکواریومی از جمله رشد، بقاء و پاسخ ایمنی ضروری به‌نظر می‌رسد (Firouzbakhsh و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از مشکلات شایع آبزی‌پروری بالا بودن میزان تلفات است که به‌دلایل متفاوتی از جمله گرسنگی، آسیب فیزیکی، استرس، آلودگی آب و در نهایت بیماری رخ می‌دهد (Rottmann و همکاران، ۱۹۹۲). محدودیت‌های استفاده از روش‌های کنترل بیماری‌ها هم‌چون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث گسترش روش‌های زیستی از جمله پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها گردید (Irianto و Austin، ۲۰۰۲؛ Gomez-Gil و همکاران، ۲۰۰۰؛ Verschuere و همکاران، ۲۰۰۰؛ Gatesoupe، ۱۹۹۹). در سال‌های اخیر به‌منظور جلوگیری از اثرات نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهی و هم‌چنین جهت بهبود وضعیت سلامت و کارایی مصرف غذا، از افزودنی‌های غذایی زیادی از جمله پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Bagheri و همکاران، ۲۰۰۸). به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در جیره‌های غذایی می‌تواند از طریق کاهش غذای لازم برای رشد ماهیان کارایی تغذیه را افزایش دهد و کاهش هزینه‌های پرورش آبزیان را در پی داشته باشد. در واقع، غذا مهم‌ترین عامل محیطی است که ترکیب اسیدهای چرب و میزان چربی بافت بدن را در ماهی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Millamena، ۱۹۹۶). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی زنده‌ای هستند که از طریق تغییر جمعیت میکروبی محیط یا میزبان و رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا، اثرات سودمندی را روی میزبان می‌گذارند. دست‌کاری جمعیت میکروبی روده لاروهای آبزیان، با استفاده از باکتری‌های انتخابی برای بهینه‌سازی آن‌ها به منظور رشد و بازماندگی بهتر از جنبه‌های مهم استفاده از پروبیوتیک‌ها است (Ringø و Birkbeck، ۱۹۹۹). مشکلاتی در استفاده از پروبیوتیک‌ها وجود دارد از جمله این‌که پروبیوتیک‌ها فقط می‌توانند در روده بزرگ عمل کنند و برای رسیدن به روده باید از موانع فیزیکی و شیمیایی بسیاری در لوله گوارش عبور کنند (Pochart و همکاران، ۱۹۹۲) و تا رسیدن به روده باید فعال بمانند. برای حفظ بقاء و فعالیت، باکتری باید بتواند به اپیتلیوم روده متصل شود. علاوه بر آن، باکتری پروبیوتیک برای دستیابی به غذا و محل مناسب جهت کلون شدن بایستی با صدها باکتری دیگر فلور روده رقابت کند (Bouhnik و همکاران، ۱۹۹۲). جهت فائق آمدن بر محدودیت‌ها و مشکلات پروبیوتیک‌ها، استفاده از پری‌بیوتیک‌ها رایج گردید. پری‌بیوتیک‌ها که به‌عنوان مواد غذایی غیر قابل هضم شناخته می‌شوند با اثر بر تحریک رشد و فعالیت تعداد معدودی از باکتری‌های مفید و پروبیوتیک در دستگاه گوارش تأثیر خود را اعمال می‌کند. امروزه فروکتوالیگوساکاریدها و اینولین از رایج‌ترین پری‌بیوتیک‌ها در اروپا، ژاپن و استرالیا بوده و تحقیقات بسیاری روی این ترکیبات متمرکز شده است (Franck، ۲۰۰۰). الیگوفروکتوزها فیبرهای غذایی محلول و قابل تخمیری می‌باشند که جزء خانواده فراکتان‌ها هستند (Roberfroid، ۲۰۰۵). علاوه بر این نشان داده شده است که اینولین جذب کلسیم و منیزیم را افزایش می‌دهد و بدین‌وسیله بر تولید گلوکز خون و کاهش میزان کلسترول و لیپیدهای سرم تأثیر می‌گذارد (Franck، ۲۰۰۰). اینولین یک کربوهیدرات گیاهی غیرقندی است که فیبر محلول دارد و از گیاهان مختلف هم‌چون سیر، پیاز، تره‌فرنگی، گل کوکب و کاسنی به‌دست می‌آید (Roberfroid، ۱۹۹۳). اما معمولاً برای تولید اینولین، از گیاه کاسنی (Cichorium intybus) استفاده می‌شود. اگرچه اینولین یک فیبر طبیعی برای ماهیان محسوب نمی‌شود، ولی به‌واسطه دارا بودن خواص پری‌بیوتیکی در تحریک باکتری‌های مفید روده و توقف رشد باکتری‌های مضر، استفاده از آن در آبزی‌پروری ایده جالب‌توجهی است (Ringø و همکاران، ۲۰۰۶). تحقیقات پیشین انجام شده در مورد تأثیر اینولین نشان‌دهنده بهبود عملکرد تولید، رشد و بقای ماهیان از قبیل بچه ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) (سروانی و همکاران، ۱۳۸۹)، کپور معمولی (*Cyprius carpio*) (Akrami و همکاران، ۲۰۱۲)، بچه ماهی سفیددریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) (Mira، ۲۰۱۱)، تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahem و همکاران، ۲۰۱۰) می‌باشد. برای بسیاری از گونه‌های ماهیان دوره لاروی مهم‌ترین و حساس‌ترین دوره زندگی محسوب می‌شود. موفقیت در پرورش لارو ماهی به‌طور عمده‌ای بر رژیم غذایی مناسبی که به‌صورت مؤثری هضم شود و نیاز ماهی برای رشد بهتر و حفظ سلامت را تأمین کند، استوار است (Giri و همکاران، ۲۰۰۲). ذرات غذا باید با توجه به اندازه کوچک دهان لارو ماهی انتخاب شود. انتخاب غذای بسیار ریز هم ممکن است به مشکل کمبود غذایی ناشی از نسبت بسیار زیاد سطح به حجم بی‌انجامد (Kim و همکاران، ۱۹۹۶). استفاده از غذای زنده در مقایسه با غذای آماده در *Oncorhynchus mykiss*، میزان رشد و وزن تر بیش‌تری را نشان داد (Akbary و همکاران، ۲۰۰۷). نخستین بار استفاده از موجودات زنده و به‌خصوص زئوپلانکتون‌ها برای تغذیه گونه‌هایی استفاده شد که نمی‌توانستند در مرحله لاروی از غذای آماده استفاده کنند (Kim و همکاران، ۱۹۹۶). در بین زئوپلانکتون‌ها میگوی آب‌شور یا آرتمیا و روتیفرها بیش‌تر برای تغذیه ماهی‌های آب شیرین استفاده می‌شوند (Bengtson و همکاران، ۱۹۹۱؛ Léger و همکاران، ۱۹۸۶).

نتایج بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که آرتمیا منبع غذایی خوبی برای لاروهای گوشت‌خواران و مراحل اولیه بسیاری گونه‌ها می‌باشد که نیاز ماهی را به‌طور کامل تأمین می‌کند (Koueta و همکاران، ۲۰۰۲). آرتمیا سخت‌پوستی است که به‌دلیل اندازه کوچک در زمان تفریخ، تغذیه غیرانتخابی و کیفیت غذایی بالا می‌تواند به‌عنوان غذای آغازین مناسبی برای بسیاری از گونه‌های ماهیان در نظر گرفته شود (Sorgeloos و همکاران، ۲۰۰۱). از زمانی‌که صنعت آبزی‌پروری و پرورش ماهی در اواخر دهه ۱۹۷۰ پیشرفت کرد، به‌تدریج تقاضا برای سیست‌های آرتمیا از حدود چند تن در سال به ۸۰۰ تن افزایش یافت که این میزان تنها ۴۰٪ از نیاز غذایی مراحل اولیه پرورش آبزیان را شامل می‌شود (Lavens و Sorgeloos، ۲۰۰۰). استفاده از ناپلیوس آرتمیا، با ارزش غذایی ۷۱-۳۷٪ پروتئین، ۳۰-۱۲٪ لیپید، ۲۳-۱۱٪ کربوهیدرات و ۲۱-۴٪ خاکستر، مزایایی دارد ازجمله این‌که ارزش غذایی بالایی دارد و نیز قابلیت کامل شدن با استفاده از غنی‌سازی را داراست (Léger و همکاران، ۱۹۸۶). برای استفاده از ناپلیوس در تغذیه ماهی بهتر است از ناپلیوس تازه هچ شده استفاده کرد زیرا پس از گذشت ۶تا۸ساعت که ناپلیوس واردمرحله دوم لاروی (متاناپلیوس) می‌شود حدود ۳۰-۲۵٪ از انرژی خود را استفاده کرده و دارای مقدار کم‌تری اسیدآمینه است که قابلیت هضم ناپلیوس توسط ماهی و در نتیجه رشد ماهی را کاهش خواهد داد (Léger و همکاران، ۱۹۸۶). اسیدهای چرب موجود در آرتمیا از سری اسید چرب‌های (n-3)۱۸:۳ و (n-3) ۲۰:۵ می‌باشد. لینولنیک اسید از سری (n-3)۱۸:۳، از جمله اسیدچرب‌های ضروری ارگانیسم‌های آب‌شیرین و ایکوزاپانتئونیک‌اسید از سری (n-3) ۲۰:۵ اسید چرب ضروری برای ارگانیسم‌های دریایی است (Kanazawa و همکاران، ۱۹۷۹). هم‌چنین گزارش شده است که در ناپلیوس آرتمیا مقادیر بالایی از HSP26(Heat Shock Protein26) وجود دارد که در صورت بیان می‌تواند از لارو در مقابل استرس‌های محیط محافظت کند. لازم به ذکر است یکی از راه‌های تقویت سیستم ایمنی زیستی، فعال نمودن مکانیسم درونی موجود می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که در صورت اعمال استرس، پروتئین‌های شوک حرارتی در بدن موجودات ترشح می‌شود که می‌تواند باعث بالا رفتن مقاومت به استرس‌های محیطی شود (جعفری و همکاران، ۱۳۹۳). ماهی گوپی یکی از ماهیان ساکن آب شیرین و از خانواده Poeciliidae است که به‌دلیل سهولت در نگه‌داری و باروری و نیز داشتن رنگ‌های زیبا و براق جزو محبوب‌ترین ماهیان زینتی در سراسر جهان (Magurran، ۲۰۰۵) و یکی از گزینه‌های مناسب جهت انجام کارهای تحقیقاتی به‌شمار می‌رود. هدف از تحقیق حاضر اپتیمم‌سازی روش استفاده از ناپلیوس تازه هچ شده آرتمیا برای تقویت رشد در ماهیان آکواریومی می‌باشد، زیرا پیش‌بینی می‌شود بتوان با تحریک تولید پروتئین‌های شوک حرارتی در ناپلیوس آرتمیا و تغذیه ماهیان گوپی با این غذا ماهیانی با سرعت رشد بهتر تولید نمود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در زمستان ۱۳۹۴ در پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه انجام گرفت. تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از: تیمار (۱) تغذیه‌شده با ناپلیوس بدون استرس، تیمار (۲) ناپلیوس استرس‌دیده، تیمار (۳) ٪۵۰ ناپلیوس بدون استرس+۵۰٪ غذای کنسانتره، تیمار (۴) ٪۵۰ ناپلیوس استرس‌دیده+۵۰٪ غذای کنسانتره، تیمار (۵) کاسنی ٪۰/۵، تیمار (۶) کاسنی ۱٪ و تیمار (۷) غذای کنسانتره. لارو ماهیان موردنیاز جهت این مطالعه‌نیز طی ماه‌های قبل توسط همین گروه تحقیقاتی از حدود ۱۰۰ جفت مولد با کم‌ترین اختلافات درون جمعیتی (مورفولوژیک) تکثیر یافته و در شرایط استاندارد پرورش داده شدند. ماهی‌ها قبل از شروع دوره غذادهی مدت ۱۰ روز با غذای کنسانتره تیمار شاهد غذادهی شدند و به شرایط آزمایشی سازگار شدند. سیست‌های *Artemia urmiana* با خلوص تائید شده و درصد هچ بالای ٪۷۵ (Manaffar، ۲۰۱۲) از سیست بانک پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه شده و جمعیتی که بهترین و بالاترین سطح HSP26 تولید شده را در شوری ۲۸۰ گرم بر لیتر دارا بودند انتخاب شد. به‌منظور تائید صحت وجود این پروتئین برای اولین بار در دنیا توالی ژن HSP26 این آرتمیا در بانک ژنی NCBI ثبت گردید (خلیل‌پور، ۱۳۹۵). تحریک تولید پروتئین شوک حرارتی HSP26 در شوری و دمای بالا (نزدیک آستانه تحمل لاروها) صورت پذیرفته و ارزیابی تولید این پروتئین‌ها به‌روش RT-PCR صورت گرفت. سپس سیست مورد نظر در شرایط استاندارد تفریخ (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۰ گرم بر لیتر) در بطری‌های ۱ لیتری مخروطی شکل، هچ و بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت تغذیه ماهی‌های تیمار ۳،۲،۱ و ۴ ذخیره شدند. ناپلیوس‌های مورد استفاده در تغذیه تیمارهای ۲ و ۴ تحت استرس شوری ۲۸۰ گرم بر لیتر (خلیل‌پور، ۱۳۹۵) قرار گرفتند. جهت آماده کردن غذای تیمارهای ۵ و ۶، ریشه کاسنی که بیش‌ترین مقدار اینولین را داراست، از عطاری معتبر تهیه و پودر گردید. ٪۰/۵ و ٪۱ پودر کاسنی با ۲۵ میلی‌گرم ژلاتین در ۵۰ سی‌سی آب مخلوط و بر روی ۵۰ گرم غذای کنسانتره اسپری شد. جهت حذف اثر ژلاتین همان میزان ژلاتین در آب حل شده و به تنهایی بر روی غذای کنسانتره شاهد نیز افزوده شد. تعداد ۱۷ ماهی جهت مقایسه با ماهی‌ها در پایان دوره، زیست‌سنجی شدند. برای این آزمایش ۵۱ عدد ماهی گوپی برای هر تیمار (حاوی ۴ تکرار ۱۷ تایی) به ظروف ۳ لیتری منتقل و به‌مدت ۳۵ روز با غذاهای مخصوص به

مقدار ۹٪ وزن بدن ماهی‌ها و در ۳ وعده تغذیه شدند. در استفاده از ناپلیوس آرتمیا ضریب تبدیل ۴:۱ غذای تر نسبت به غذای خشک جهت جلوگیری از تغذیه یک تیمار با غذای اضافی مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت آب طی این دوره در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، pH در محدوده ۰/۵±۷/۵ و دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. در پایان دوره ۳۵ روزه، زیست‌سنجی ۱۲ ماهی از هر تیمار (۳ ماهی از هر تکرار) پس از بی‌هوشی توسط پودر گل میخک انجام گرفت. جهت بررسی شاخص‌های رشد از فرمول‌های زیر استفاده گردید:

افزایش طول (Wang و همکاران، ۲۰۰۳):

(طول کل:TLطول نهایی:Lf؛ طول اولیه:Li؛ (Lf-Li)=(سانتی‌متر)TL

افزایش وزن (Huang و همکاران، ۲۰۰۸):

(افزایش وزن:W؛ وزن نهایی:BWfوزن اولیه:Bwi؛ BWf-Bwi=(گرم)WG

ضریب رشد ویژه (Huang و همکاران، ۲۰۰۸):

(دوره رشد برحسب روز:t؛ وزن نهایی:Wf؛ وزن اولیه: Wi) ;SGR=Ln(Wf)-Ln(Wi) × 100 /t

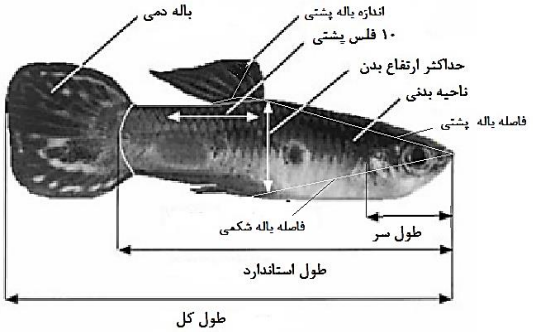
ضریب چاقی (Grant و همکاران، ۲۰۰۸):

(طول ماهی:L؛ وزن ماهی:W) ;CF=W(g)/L3(سانتی‌متر)×100

درصد افزایش وزن (Hung و همکاران، ۱۹۸۹):

(متوسط وزن اولیه:Bwi؛ متوسط وزن نهایی: BWf) ;BWI%=(BWf_BWi)/BWi×100

علاوه بر شاخص‌های رشد تعدادی از فاکتورهای زیست‌سنجی ماهی‌ها هم طبق قسمت‌های مشخص شده در شکل ۱ توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. میانگین زیست‌سنجی در ابتدا و انتهای دوره با یکدیگر مقایسه شد. به‌منظور بررسی و تحلیل بهتر تعدادی از شاخص‌های زیست‌سنجی به‌صورت نسبی نسبت به طول یا وزن کلی محاسبه و نتایج در جدول ارائه شده است. با توجه به این‌که در این سن ماهیان بالغ نیستند لذا انتخاب نمونه برای زیست‌سنجی به‌صورت کاملا تصادفی صورت گرفته و به صفات ظاهری توجه نشد.



شکل ۱: شاخص‌های اندازه‌گیری شده در ماهی گوپی: طول استاندارد، طول کل، فاصله باله شکمی، طول سر، حداکثر ارتفاع بدن، فاصله اولین باله پشتی، طول اولین باله پشتی (Hajjej و همکاران، ۲۰۱۱)

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از این آزمایش در مورد رشد ماهی‌ها و مقایسه تیمارها با ابتدای دوره و نیز تیمار شاهد با روش آماری One Way ANOVA و آزمون Tukey با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

شاخص‌های رشد بررسی شده نشان داد در فاکتورهای افزایش وزن، افزایش طول، ضریب رشد ویژه و درصد افزایش وزن اختلاف معنی‌داری مابین ۴ تیمار اول تغذیه شده با ناپلیوس با بقیه تیمارها خصوص تیمار شاهد وجود دارد (P<۰/۰۵). این اختلاف خصوصاً در تیمارهایی که با ناپلیوس استرس دیده تغذیه شده بودند بیش‌تر بوده و بعضاً معنی‌دار نیز می‌باشد. نتایج این بخش از تحقیق نشان داد که استفاده از کاسنی در فاکتورهای وزن‌گیری و افزایش طول ماهی مؤثر نبوده است (P>۰/۰۵). بهترین افزایش وزن در تیمار ۲ (تغذیه با ناپلیوس استرس‌دیده) حاصل شده است. که ازنظر افزایش طول و ضریب رشد ویژه نیز این ماده غذایی مؤثر بوده است (با وجود عدم اختلاف معنی‌دار). در رتبه دوم تیمار ترکیبی ۴ (کنسانتره+ناپلی استرس‌دیده) قرار دارد. نکته قابل‌توجه این‌که در فاکتور افزایش طول تغذیه با ناپلی استرس دیده موجب تولید ماهیان همگنی با کم‌ترین انحراف معیار شده است. برترین ترکیب غذایی برای القاء بالاترین ضریب‌چاقی تیمار۴(٪۵۰ناپلیوس استرس‌دیده+۵۰٪ غذای کنسانتره) ثبت شد.

در جدول ۲ میانگین تعدادی از ویژگی‌های زیست‌سنجی ماهیان در تیمارهای مختلف آورده شده است. این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین میزان وزن و طول کلی در ۴ تیمار اول تغذیه شده با ناپلیوس آرتمیا (به‌صورت ترکیبی و منفرد) نسبت به تیمارهای کاسنی و شاهد حاصل شده است (P<۰/۰۵). بررسی دقیق‌تر نشان می‌دهد از بین این ۴ تیمار موفق در رشد دو تیمار تغذیه شده با ناپلیوس استرس‌دیده (ترکیبی و منفرد) نتایج بهتری را حتی نسبت به دو تیمار دیگر که از ناپلیوس بدون استرس استفاده کرده بودند دارا هستند. البته این اختلاف معنی‌دار نیست ولی رکورد بهترین نتیجه را در بین تمامی تیمارها نشان می‌دهد. نکته قابل توجه این‌که تغذیه با ناپلیوس استرس دیده موجب کاهش طول سرنسبت به طول کلی بدن شده است. هم‌چنین این رژیم غذایی تاثیر قابل توجهی در اندازه باله، دم و زوائد ماهی داشت.

جدول ۱: میانگین± انحراف معیار شاخص‌های رشد در ماهی گوپی در تیمارهای مختلف (طول سانتی‌متر و وزن گرم)

تیمار	افزایش وزن	افزایش طول	ضریب رشد ویژه	ضریب چاقی	درصد افزایش وزن
۱	۰/۱۵۹±۰/۰۳۰^{a}	۱/۰۵۹±۰/۱۲۷^{a}	۳/۳۰۸±۰/۴۶۲^{a}	۱/۰۰۹±۰/۰۱۹^{ab}	۱۹۹/۵۸۰±۳۸/۶۱۵^{a}
۲	۰/۲۲۰±۰/۰۱۷^{a}	۱/۲۵۰±۰/۰۴۰^{a}	۳/۷۷۰±۰/۱۶۸^{a}	۱/۰۴۴±۰/۰۲۳^{ab}	۲۷۵±۲۱/۷۹۴^{a}
۳	۰/۱۸۱±۰/۰۰۴^{a}	۱/۱۱۶±۰/۰۵۵^{a}	۳/۳۸۲±۰/۰۵۳^{a}	۱/۰۴۳±۰/۰۵۷^{ab}	۲۲۷/۰۸۰±۶/۱۶۶^{a}
۴	۰/۲۱۹±۰/۰۳۷^{a}	۱/۲۱۸±۰/۱۳۷^{a}	۳/۷۴۸±۰/۳۷۶^{a}	۱/۰۶۹±۰/۰۱۳^{a}	۲۷۳/۷۵۰±۴۷/۴۸۳^{a}
۵	۰/۰۷۷±۰/۰۲۰^{b}	۰/۷۲۷±۰/۰۷۰^{b}	۱/۹۰۷±۰/۳۷۱^{b}	۰/۹۵۴±۰/۰۵۳^{b}	۹۶/۲۵۰±۲۵/۰۹۳^{b}
۶	۰/۰۵۶±۰/۰۱۰^{b}	۰/۵۹۵±۰/۰۸۰^{b}	۱/۵۲۱±۰/۲۲۶^{b}	۰/۹۷۸±۰/۰۲۱^{ab}	۷۰/۸۳۳±۱۳/۳۶۵^{b}
۷	۰/۰۷۱±۰/۰۲۴^{b}	۰/۶۴۹±۰/۰۸۸^{b}	۱/۷۸۸±۰/۴۴۱^{b}	۱/۰۰۵±۰/۰۴۹^{ab}	۸۸/۷۵۰±۳۰/۳۳۶^{b}

*حروف متفاوت (به‌صورت عمودی) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد. تیمارها به‌ترتیب: (۱) تغذیه شده با ناپلیوس بدون استرس؛ تیمار (۲) ناپلیوس استرس‌دیده؛ تیمار (۳) ۵۰٪ ناپلیوس بدون استرس+۵۰٪ غذای کنسانتره؛ تیمار (۴) ۵۰٪ ناپلیوس استرس‌دیده+۵۰٪ غذای کنسانتره؛ تیمار(۵) کاسنی ۰/۵٪؛ تیمار (۶) کاسنی ۱٪؛ تیمار (۷) غذای کنسانتره.

جدول ۲: میانگین±انحراف معیار شاخص‌های زیست‌سنجی ماهیان گوپی و مقایسه آن‌ها بین تیمارهای مختلف (میلی‌متر)

شاخص تیمار	وزن	طول	وزن/طول	فاصله بانه شکمی	فاصله بانه شکمی/ طول	طول سر	طول سر/طول	حداکثر ارتفاع بدن	حداکثر ارتفاع بدن/طول	فاصله بانه پشتی	فاصله بانه پشتی/ طول	طول بانه پشتی	طول بانه پشتی/ طول	طول استاندارد	طول استاندارد/طول
۱	۰/۲۳±۰/۰۳^{ab}	۲۸/۷۱±۱/۶۹^{a}	۰/۰۰۸±۰^{ab}	۱۲/۳۱±۱/۶۲^{ab}	۰/۴۷±۰/۰۴^{a}	۵/۰۵±۰/۳۹^{a}	۰/۱۷±۰/۰۰۶^{a}	۵/۶۷±۰/۳۷^{a}	۰/۱۹±۰/۰۰۸^{ab}	۱۲/۴۷±۰/۹۶^{a}	۰/۴۳±۰/۰۱^{a}	۱/۸۷±۰/۱۸^{ab}	۰/۰۶±۰/۰۰۶^{ab}	۲۳/۰۴±۱/۴۶^{a}	۰/۸±۰/۰۱^{a}
۲	۰/۳۰±۰/۰۵^{a}	۳۰/۶۲±۱/۷۴^{a}	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱^{a}	۱۳/۶۶±۱/۵۰^{a}	۰/۴۴±۰/۰۳^{ab}	۵/۱۴±۰/۴۸^{a}	۰/۱۶±۰/۰۰۹^{a}	۶/۳±۰/۴۸^{a}	۰/۲۰±۰/۰۰۹^{ab}	۱۳/۴۷±۱/۱۱^{a}	۰/۴۳±۰/۰۲^{a}	۱/۹۵±۰/۲۲^{ab}	۰/۰۶±۰/۰۰۴^{ab}	۲۴/۴۱±۱/۸۶^{a}	۰/۷۹±۰/۰۲^{a}
۳	۰/۲۶±۰/۰۵^{ab}	۲۹/۱۹±۱/۶۵^{a}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱^{a}	۱۲/۴۵±۱/۸۷^{a}	۰/۴۲±۰/۰۴^{a}	۵/۰۷±۰/۴۴^{a}	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۶/۰۹±۰/۵۴^{a}	۰/۲۰±۰/۰۱^{a}	۱۲/۵۶±۱/۳۳^{a}	۰/۴۲±۰/۰۲^{a}	۱/۷۴±۰/۱۵^{bc}	۰/۰۵±۰/۰۰۴^{b}	۲۳/۲۷±۲/۱۹^{a}	۰/۷۹±۰/۰۳^{a}
۴	۰/۲۹±۰/۰۷^{a}	۳۰/۳۰±۱/۷۳^{a}	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱^{a}	۱۳/۲۲±۲/۱۸^{a}	۰/۴۳±۰/۰۵^{ab}	۵/۱۸±۰/۶^{a}	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۶/۳۵±۰/۵۸^{a}	۰/۲۰±۰/۰۱^{a}	۱۳/۲۱±۱/۵۵^{a}	۰/۴۳±۰/۰۳^{a}	۲/۰۵±۰/۱۷^{a}	۰/۰۶±۰/۰۰۳^{a}	۲۴/۳۲±۲/۱۵^{a}	۰/۸±۰/۰۳^{a}
۵	۰/۱۵±۰/۰۳^{c}	۲۵/۳۹±۱/۶۷^{b}	۰/۰۰۶±۰/۰۰۱^{bcd}	۱۰/۳۷±۱^{b}	۰/۴۰±۰/۰۳^{b}	۴/۴۳±۰/۳۴^{b}	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۴/۸۵±۰/۵۷^{b}	۰/۱۹±۰/۰۱^{b}	۱۰/۸۶±۰/۷۸^{b}	۰/۴۲±۰/۰۲^{a}	۱/۴۹±۰/۱۴^{cd}	۰/۰۵±۰/۰۰۴^{b}	۲۰/۲۹±۱/۲۹^{b}	۰/۷۹±۰/۰۲^{a}
۶	۰/۱۳±۰/۰۴^{c}	۲۴/۰۷±۲/۲۹^{b}	۰/۰۰۵±۰/۰۰۱^{d}	۱۰/۴۸±۱/۲۸^{b}	۰/۴۳±۰/۰۲^{ab}	۴/۳۵±۰/۳۱^{b}	۰/۱۸±۰/۰۱^{a}	۴/۷۱±۰/۷۱^{b}	۰/۱۹±۰/۰۱^{ab}	۱۰/۳۲±۱/۱۵^{b}	۰/۴۲±۰/۰۱^{a}	۱/۴۲±۰/۲۵^{c}	۰/۰۵±۰/۰۰۸^{b}	۱۹±۲/۰۶^{b}	۰/۷۸±۰/۰۱^{a}
۷	۰/۱۵±۰/۰۵^{c}	۲۴/۶۱±۲/۳۸^{b}	۰/۰۰۵±۰/۰۰۲^{cd}	۱۲/۲۲±۱/۳۴^{ab}	۰/۴۳±۰/۰۳^{ab}	۴/۴۲±۰/۵۳^{b}	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۴/۴۲±۰/۵۳^{b}	۰/۱۹±۰/۰۱^{ab}	۱۰/۶۵±۱/۳۷^{b}	۰/۴۳±۰/۰۱^{a}	۱/۵۰±۰/۲۱^{cd}	۰/۰۶±۰/۰۰۶^{ab}	۱۹/۴۶±۲/۲۲^{b}	۰/۷۹±۰/۰۱^{a}

- حروف متفاوت (به‌صورت عمودی) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

محققان دریافته‌اند که باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، آنزیم‌های گوارشی تولید می‌کنند که باعث هضم بهتر غذا می‌شود (Kedia و همکاران، ۲۰۰۷). برهمین اساس مطالعات بسیاری در زمینه تأثیر مکمل‌های غذایی و پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در آبزیان صورت گرفته است. در برخی از این مطالعات عنوان شده که استفاده از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک باعث افزایش سیستم ایمنی، مقاومت بهتر در برابر پاتوژن‌ها و نیز رشد بهتر موجودات از جمله کپور معمولی (*Cyprius carpio*)(Akramiوهمکاران، ۲۰۱۲) می‌گردد (Yousefian و Sheikholeslami Amiri، ۲۰۰۹). این محققان هم‌چنین اظهار داشتند که ماهی تمایل به خوردن غذای غنی‌شده با پروبیوتیک را دارد که این منجر به افزایش رشد ماهی می‌گردد. Mira (۲۰۱۱) از مقادیر ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ اینولین به‌عنوان یک ماده پری‌بیوتیک جهت تغذیه بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) استفاده کرد و نتیجه گرفت که اینولین ۰/۵ در مقایسه با تیمار شاهد تأثیر بسیار زیادی در رشد و کارایی غذای ماهی‌ها داشته است. Mahious و Ollevier (۲۰۰۵) نیز دریافتند که اینولین و اولیگوفروکتوز رشد ماهی خاویار سیبری (*Acipenser baerii*) و گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) را بهبود می‌بخشند. نتایج تحقیق حاضر هم‌چون برخی دیگر از تحقیقات که نشان می‌دهند، اینولین به‌تنهایی تأثیری بر رشد آبزیان ندارد، نشان داد که تیمارهای تغذیه‌شده با کاسنی ۰/۵٪ و ۱٪ در مقایسه با تیمار شاهد تفاوتی نشان نداد. در تحقیقی دیگر نیز میزان رشد و بازماندگی بچه ماهی سفید تغذیه‌شده با اینولین در مقایسه با مانان و ترکیب مانان و اینولین کم‌تر بوده است (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۲). درخصوص تأثیر کم اینولین بر آبزیان پرورشی Olsen و همکاران (۲۰۰۱) با اضافه کردن اینولین به غذای

ماهی چارقطبی (*Salvelinus alpinus*) دریافتند که استفاده از اینولین به‌علت تجزیه و تخمیر نشدن آن باعث تجمع کربوهیدرات‌ها و اثر زیان‌بار بر سلول‌های آنتروسیت روده می‌شود که شاید دلیلی بر تأثیر کم اینولین بر رشد آبزیان باشد. در آزمایش حاضر، استفاده از کاسنی به‌عنوان منبع اینولین نیز می‌تواند مزید بر علت باشد زیرا ماهی‌ها در ابتدای دوره غذادهی رغبتی به خوردن غذا نشان نمی‌دادند و تا پایان دوره نیز کم‌ترین مقدار غذا را در مقایسه با دیگر تیمارها استفاده کردند.البته جهت حل این مشکل از شیرین‌کننده‌های طبیعی استفاده شد ولی می‌توان از دیگر اولیگوساکاریدها که به‌دلیل ساختار شیمیایی ودرجه پلیمریزاسیون منوساکاریدهای موجود در آن، طعم شیرینی را داراهستند (Crittenden، ۱۹۹۹؛ Voragen، ۱۹۹۸) و سبب طعم‌دهی مطلوب به غذا می‌شود (Crittenden، ۱۹۹۹) استفاده کرد.

در زمینه استفاده از آرتمیا و ناپلیوس آرتمیا در تغذیه ماهی‌ها مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. به‌عنوان مثال Roozbehfar و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که ماهی‌های کپور تغذیه‌شده با ناپلیوس *آرتمیا اورمیانا* و ناپلیوس *آرتمیا پارتنوژنتیکا*، بالاترین میزان رشد و تغذیه را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان دادند. علاوه بر آن Roozbehfar و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی دیگر به این نتیجه رسیدند که استفاده از ناپلیوس آرتمیا در تغذیه لارو گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) میزان بقاء را تا حد زیادی افزایش می‌دهد. ازآن‌جایی‌که آرتمیا یکی از بهترین غذاهای زنده ماهی‌ها محسوب می‌شود و تحقیقات نشان‌دهنده تأثیر مثبت آرتمیا بر رشد ماهی‌ها می‌باشند در این آزمایش از ناپلیوس آرتمیا جهت بهبود رشد ماهی‌ها استفاده شد. با این‌که میزان رشد در تیمارهای تغذیه‌شده با ناپلیوس‌ها، در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه‌شده با کاسنی بسیار چشم‌گیر بود، اختلاف تیمارهای تغذیه‌شده با ناپلیوس استرس دیده‌باتیمارهای‌تغذیه‌شده با ناپلیوس بدون استرس براساس‌آنالیزهای آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد، اما با مقایسه میزان افزایش وزن و طول در این تیمارها می‌توان به این نکته پی برد که تغذیه با ناپلیوس استرس‌دیده رشد ماهی را افزایش می‌دهد. این اختلاف در ویژگی‌های ظاهر ماهیان (از نظر باله و رنگ و زیبایی) و حتی فعالیت روزانه ماهیان این تیمار به‌شدت چشمگیر بود. با این‌که در این مقاله موضوع پروتئین‌های شوک حرارتی به‌علت حجم زیاد اطاعات مورد بحث قرار نگرفت ولی مطالعات زیادی درخصوص فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی داخل‌سلولی‌جهت‌بیان HSPانجام‌گرفته‌است.تمام‌استرس‌های‌شناخته شده‌اگر به‌اندازه‌کافی‌شدیدباشندمنجربه‌بیان HSP می‌شوند. تحقیقات سال‌های‌اخیرنشان داده است که می‌توان به‌صورت مصنوعی با تحریک پروتئین‌های شوک حرارتی باعث تقویت سیستم دفاعی موجود در برابراسترس‌های محیطی شد(Saravanakumarو Soundarapandian، ۲۰۰۹). پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی میزان استرس در جانداران در نظر گرفته می‌شوند (Iwama و همکاران، ۱۹۹۸؛ Sanders، ۱۹۹۵). این پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌درون‌سلولی‌هم درسلول‌های‌پروکاریوت‌وهم‌درسلول‌های یوکاریوت شناسایی شده‌اند (Lindquist و Craig، ۱۹۹۸). در شرایطی که سلول تحت تأثیر استرس قرار می‌گیرد این پروتئین‌ها ترشح می‌شوند و باعث مقاومت سلول در برابر استرس می‌شود (Baruah و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به نقش پروتئین‌های شوک حرارتی در افزایش مقاومت جاندار نسبت به استرس‌های محیطی و با توجه به این‌که افزایش سطح این پروتئین‌ها در بدن عموماً نیازمند ایجاد استرس و شوک خارجی بوده و اغلب مواقع نمی‌تواند به‌موقع موجب بروز مقاومت داخلی شود. لذا در تعدادی از بررسی‌های مقدماتی انجام شده بر روی موجودات مختلف نشان داده شده که تغذیه با این دسته از پروتئین‌ها نیز می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی موجود زنده شود. در این تحقیقات مشخص شده است که این دسته از پروتئین‌ها دارای‌ساختمان‌تقریباًیکسانی‌در اغلب موجودات می‌باشند و در صورت ورود این پروتئین‌ها به هر نحو، رشد و بقاء در شرایط استرس‌زای محیطی تقویت خواهد شد (Soundarapandian و Saravanakumar، ۲۰۰۹). در این‌خصوص به اثبات رسیده هست که حتی اگر باکتری *Escherichia coli* (Baruah و همکاران، ۲۰۱۰) و یا مخمر تک‌سلولی حاویHSP فعال، جهت تغذیه لارو آرتمیا مورد استفاده قرار گیرد، باعث افزایش مقاومت آن در برابر استرس می‌شود (جعفری‌و همکاران، ۱۳۹۳). با استناد به نتایج این تحقیق و مطالعات پیشین اشاره شده توسط همین گروه تحقیقاتی به‌نظر می‌رسد استفاده از لارو آرتمیای استرس دیده می‌تواند نقش اساسی در ایجاد مقاومت و رشد بهتر در لارو دیگر آبزیان داشته باشد.

اگرچه در این تحقیق حیوان مدل یک ماهی زینتی انتخاب شده است، اما با تعمیم دادن نتایج آن به پرورش ماهیان خوراکی، با توجه به این‌که با افزایش جمعیت جهان و نیاز به غذا و منابع پروتئینی نیز بیش‌تر می‌شود و ماهیان و آبزیان سهم زیادی از غذای جهان را شامل می‌شوند، می‌توان دریافت که‌باتغییرجیره غذایی ماهیان در استخرهای پرورش و استفاده از ناپلیوس استرس دیده می‌توان بازدهی و سود حاصل از افزایش وزن ماهی‌ها را تا میزان زیادی افزایش داد. استفاده از آرتمیا جهت افزایش رشد ماهیان آکواریومی سال‌هاست موردتوجه می‌باشد. لیکن نتایج اخیر اثبات کرد که به‌دلیل گران بودن سیست آرتمیا،استفاده از یک جیره ترکیبی (۵۰٪ ناپلیوس استرس‌دیده+۵۰٪ غذای کنسانتره) مشروط بر این‌که یک استرس کوتاه‌مدت کنترل‌شده به‌مدت ۴ ساعت بر ناپلیوس‌های آرتمیا اعمال شود، می‌تواند نتایج بهتری در رشد ماهی گوپی و شاید دیگر گونه‌های ماهیان

آکواریومی حاصل نماید. با توجه به نتایج ضعیف استفاده از کاسنی و احتمال عدم مقبولیت مزه این ماده توصیه می‌شود جهت افزودن اینولین به غذای ماهی‌ها از دیگر منابع آن استفاده کرد یا به طریقی مثل افزودن ماده‌ای با طعم دلخواه ماهی، آن را به غذای موردعلاقه ماهی تبدیل کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه جهت فراهم نمودن امکانات اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱. **اکرمی، ر.؛ چیت‌ساز، ح.؛ دشتیان، ص. و رازقی‌منصور، م.، ۱۳۹۲.** تأثیر پروبیوتیک اینولین و مانان الیگوساکارید به‌صورت مجزا و توام با عملکرد رشد، بازماندگی، ترکیب لاشه و مقاومت به استرس شوری در بچه ماهی سفید. فصلنامه علوم و فنون شیلات. دوره ۲، شماره ۳، صفحه ۱۷.

۲. **جعفری، گ.؛ مناف‌فر، ر. و زارع، ص.، ۱۳۹۳.** تأثیر تغذیه با مخمر تحریک‌شده حاوی پروتئین‌های شوک حرارتیHSP بر میزان رشد، بقاء و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در دو گونه *Artemia urmiana* و *Artemia franciscana*. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۶، شماره ۴، صفحات ۹۳ تا ۱۰۱.

۳. **خلیل‌پور، ه.، ۱۳۹۵.** تأثیر تغذیه با ناپلیوس آرتمیا حاوی پروتئین‌های شوک حرارتی بر ویژگی‌های رشد، بقاء و مقاومت نسبت به استرس‌های محیطی در ماهی گوپی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد زیست فناوری دریا. دانشگاه ارومیه. ۱۳۵ صفحه.

۴. **Akbary, P.; Hosseini, S.A.; Imanpoor, M.; Sudagar, M. and Makhdomi, N.M., 2007.** Comparison between live food and artificial diet on survival rate, growth and body chemical composition of *Oncorhynchus mykiss* larvae. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 9, No. 1, pp: 19-32.

۵. **Akrami, R.; Ghelichi, A. and Zarei, E., 2012.** Effect of Dietary of supplementation prebiotic inulin on growth, survival, lactic acid bacteria loading and body composition of carp juvenile (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries, Islamic Azad University Azadshahr Branch. Vol. 5, No. 4, pp: 87-94.

۶. **Bagheri, T.; Hedayati, S.A.; Yavari, V.; Alizade, M. and Farzanfar, A., 2008**. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout *(Onchorhynchus mykiss)* fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Vol. 8, No. 1, pp: 43-48.

۷. **Bengtson, D.A.; Leger, P. and Sorgeloos, P., 1991.** Use of Artemia as a food source for aquaculture. *In*: R.A. Broune; P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman (eds.), Artemia biology. CRC Press, Boca Raton, FL., USA. pp: 255-280.

۸. **Bouhnik, Y.; Pochart, P.; Marteau, P.; Arlet, G.; Goderei, I. and Rambaud, J.C., 1992.** Fecal recovery in humans of viable Bifidobacterium sp. ingested in fermented milk. Gastroenterology. Vol. 102, pp: 875-878.

۹. **Baruah, K.; Norouzitallab, P.; Shihao, L.; Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2013.** Feeding truncated heat shock protein ٧٠s protect *Artemia franciscana* against virulent *Vibrio campbellii* challenge. Fish & shellfish immunology, Vol. 34, No. 1, pp. 183-191.

۱۰. **Baruah, K.; Ranjan, J.; Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2010**. Efficacy of heterologous and homologous heat shock protein 70s as protective agents to *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. Fish and shellfish immunology. Vol. 29, No. 5, pp: 733-739.

۱۱. **Crittenden, R.G. and Tannock, G.W., 1999.** Probiotics: A critical review. Horizon Scientific. Wynondhan. UK. pp: 141-156.

۱۲. **FAO. 2014.** Aquaculture Department. 2014. The state of world fisheries and aquaculture 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 243 P.

۱۳. **Firouzbakhsh, F.; Noori, F.; Khalesi, M.K. and Jani Khalili, K., 2011.** Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish physiology and biochemistry. Vol. 37, No. 4, pp: 833-842.

۱۴. **Franck, A.M.E., 2000.** Inulin and oligofructose. LFRA Ingredient Handbook: Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Publishing, Surrey. pp: 1-18.

۱۵. **Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. Vol. 180, No. 1–2, pp: 147-165.

۱۶. **Giri, S.S.; Sahoo, S.K.; Sahu, B.B.; Sahu, A.K.; Mohanty, S.N.; Mukhopadhyay, P.K. and Ayyappan, S., 2002.** Larval survival and growth in *Wallago attu* (Bloch and Schneider): effects of light, photoperiod and feeding regimes. Aquaculture. Vol. 213, No.1, pp: 151-161.

۱۷. **Gomez Gil, B.; Thompson, F.L.; Thompson, C.C. and Swings, J., 2003.** *Vibrio pacinii* sp. nov., from cultured aquatic organisms. International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol. 53, No. 5, pp: 1569-1573.

۱۸. **Grant, A.A.; Baker, D.; Higgs, D.A.; Brauner, C.J.; Richards, J.G.; Balfry, S.K. and Schulte, P.M., 2008.** Effects of dietary canola oil level on growth, fatty acid composition and osmoregulatory ability of juvenile fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture. Vol. 277, No. 3, pp: 303-312.

۱۹. **Hajjej, G.; Hattour, A.; Hajjej, A.; Allaya, H.; Jarboui, A. and Bouain, A., 2011.** Biometry, length-length and length-weight relationships of little tuna *Euthynnus alletteratus* in the Tunisian waters. Journal of fisheries and Aquatic Science. Vol. 6, No. 3, pp: 256.

۲۰. **Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & shellfish immunology. Vol. 42, No. 2, pp: 533-538.

۲۱. **Huang, S.S.Y.; Fu, C.H.L.; Higgs, D.A.; Balfry, S.K.; Schulte, P.M. and Brauner, C.J., 2008.** Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ionoregulatory development of spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Aquaculture. Vol. 274, No. 1, pp: 109-117.

۲۲. **Hung, S.S.; Lutes, P.B.; Conte, F.S. and Storebakken, T., 1989.** Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub-yearlings at different feeding rates. Aquaculture. Vol. 80, No. 1, pp: 147-153.

۲۳. **Ibrahem, M.D.; Fathi, M.; Mesalhy, S. and El-Aty, A.A., 2010.** Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 29, No. 2, pp: 241-246.

۲۴. **Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. Vol. 25, No. 11, pp: 633-642.

۲۵. **Iwama, G.K.; Thomas, P.T.; Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M., 1998.** Heat shock protein expression in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Vol. 8, No. 1, pp: 35-56.

۲۶. **Kanazawa, A.; Teshima, S.I. and Ono, K., 1979.** Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. Vol. 63, No. 3, pp: 295-298.

۲۷. **Kedia, G.; Wang, R.; Patel, H. and Pandiella, S.S., 2007.** Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. Process Biochemistry, Vol. 42, No. 1, pp: 65-70.

۲۸. **Kim, J.; Massee, K.C. and Hardy, R.W., 1996.** Adult Artemia as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture. Vol. 144, No. 1, pp: 217-226.

۲۹. **Koueta, N.; Boucaud-Camou, E. and Noel, B., 2002.** Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. Aquaculture. Vol. 203, No. 3, pp: 293-310.

۳۰. **Lavens, P. and Sorgeloos, P., 2000.** The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. Aquaculture. Vol. 181, No. 3, pp: 397-403.

۳۱. **Léger, P.; Bengtson, D.A.; Simpson, K.L. and Sorgeloos, P., 1986.** The use and nutritional value of Artemia as a food source. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review. Vol. 24. pp: 521-623.

۳۲. **Lindquist, S. and Craig, E.A., 1988.** The heat-shock proteins. Annual review of genetics. Vol. 22, No.1, pp: 631-677.

۳۳. **Magurran, A.E., 2005.** Evolutionary ecology: The Trinidadian guppy. Oxford University Press, Oxford, U.K. 24 P.

۳۴. **Mahious, A.S. and Ollevier, F., 2005.** Probiotics and prebiotics in aquaculture: review. In: 1st Regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture AAARC, Urmia, Iran. pp: 17-26.

۳۵. **Manaffar, R., 2012.** Genetic diversity of Artemia populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 160 P.

۳۶. **Millamena, O.M., 1996.** Training course on fish nutrition. Part: Lipids and Fatty Acids. pp: 1-19.

۳۷. **Mira, S.M., 2011.** Effect of dietary inulin as prebiotic on growth, survival and intestinal bacterial density of kutum *(Rutilus frisii kutum*) fry. Thesis for M.Sc. of Islamic Azad University, Qaemshahr Branch. P: 77.

۳۸. **Olsen, R.E.; Myklebust, R.; Kryvi, H.; Mayhew, T.M. and Ringø, E., 2001.** Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). Aquaculture Research. Vol. 32, No. 11, pp: 931-934.

۳۹. **Pochart, P.; Marteau, P.; Bouhnik, Y.; Goderel, I.; Bourlioux, P. and Rambaud, J.C., 1992.** Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. The American journal of clinical nutrition. Vol. 55, No. 1, pp: 78-80.

۴۰. **Ringø, E. and Birkbeck, T.H., 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquaculture research. Vol. 30, No. 2, pp: 73-93.

۴۱. **Ringø, E.; Sperstad, S.; Myklebust, R.; Refstie, S. and Krogdahl, Å., 2006**. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. Aquaculture. Vol. 261, No. 3, pp: 829-841.

۴۲. **Roberfroid, M., 1993.** Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. Vol. 33, No. 2, pp: 103-148.

۴۳. **Roberfroid, M.B., 2005.** Inulin type Fructans: Functional Food Ingredients. New York: CRC Press.

۴۴. **Roozbehfar, R.; Jamali, H. and Hematian, R., 2012.** The potential of Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in exploitation of *Artemia urmiana* in comparison with Daphnia sp. and its mixture. World Appl. Sci. J. Vol. 20, No. 6, pp: 776-780.

۴۵. **Roozbehfar, R.; Jamali, H.; Jafari, M. and Hematian, R., 2013.** A Comparative Study on the Growth Rate of Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, Larvae Fed with *Artemia urmiana* and *Daphnia* sp. Global Veterinaria. Vol. 10, No. 2, pp: 116-120.

۴۶. **Rottmann, R.W.; Francis Floyd, R.; Reed, P.A. and Durborow, R., 1992**. Submitting a sample for fish kill investigation. SRAC Publication. No. 472, pp: 2.

۴۷. **Sanders, B.M.; Nguyen, J.; Martin, L.S.; Howe, S.R. and Coventry, S., 1995.** Induction and subcellular localization of two major stress proteins in response to copper in the fathead minnow *Pimephales promelas*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 112, No. 3, pp: 335-343.

۴۸. **Sorgeloos, P.; Dhert, P. and Candreva, P., 2001.** Use of the brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture. Aquaculture. Vol. 200, No. 1, pp: 147-159.

۴۹. **Soundarapandian, P. and Saravanakumar, G., 2009.** Effect of Different Salinities on the Survival and Growth of *Artemia* Spp Current Research Journal of Biological Sciences. Vol. 1, No. 2, pp: 20-22.

۵۰. **Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbial Molecular Biology Reviews. Vol. 64, No. 4, pp: 655-671.

۵۱. **Voragen, A.G., 1998.** Technological aspects of functional food-related carbohydrates. Trends in Food Science and Technology. Vol. 9, No. 8, pp: 328-335.

۵۲. **Wang, X.; Kim, K.W. and Bai, S.C., 2003.** Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture. Vol. 225, No. 1, pp: 387-395.

۵۳. **Yousefian, M. and Sheikholeslami Amiri, M., 2009.** A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. African Journal of Biotechnology. Vol. 8, No. 25, pp: 7313-7318.