# تاثیر استفاده ازسطوح مختلف باکتری *Pediococous acidlactici* در جیره غذایی بر میزان بقاء مولدین، تولید سیست وناپلی، میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی و تعداد کلنی تشکیل شده در دستگاه‌گوارش آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)


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


تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۳

## چکیده

**این مطالعه به‌منظور بررسی اثر استفاده از باکتری *Pediococous 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 اسیدی‌لاکتیکی تشکیل شده در دستگاه گوارش آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) انجام شد. در این آزمایش از سه سطح ۱۰۲ (تیمار اول)، ۱۰۴ (تیمار دوم)، ۱۰۶ (تیمارسوم) CFU باکتری در هر گرم غذا و تیمار شاهد (بدون پروبیوتیک) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (٤ تیمار هر یک در ۳ تکرار) به‌صورت روزانه استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار تعداد سیست و ناپلی تولید شده توسط مولدین آرتمیا فرانسیسکانا و هم‌چنین میزان بقاء مولدین آرتمیا درتیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد بود (p<۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار تولید سیست در تیمار دوم (۲۱۵ عدد) به‌دست آمد و بیش‌ترین مقدار تولید ناپلی ازمولدین 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 درتیمار دوم مقادیر آنزیم‌های لیزوزیم (٤/۱۵) واحد بر میکرو گرم پروتئین، فنولوکسیداز (۲/۷٤) و سوپراکسید دیسموتاز (۲/۹۰±۰/۸۲) واحد بر دقیقه بیش‌ترین مقدار بود درحالی‌که 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<۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد داشت. تعداد کلنی باکتری پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی موجود در دستگاه گوارش (CFU در میلی‌لیتر) در تیمار اول، ۷٦۰ CFU بود که بیش‌ترین مقدار را نسبت به گروه شاهد (۵۰۰) نشان داد. با توجه به نتایج ذکرشده از این بررسی مقدار پروبیوتیک برای تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا CFU۱۰۲ و CFU۱۰٤ درگرم غذا پیشنهاد می‌گردد.**

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



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shjabari91@gmail.com

## مقدمه

مهم‌ترین کاربرد آرتمیا مربوط به صنعت آبزی‌پروری 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 آبزی پروری در مراحل مختلف زندگی مورد استفاده قرار داد. آرتمیا از نظر تغذیه‌ای، فیلترکننده غیرانتخابی است، بدین معنا که از کلیه 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 هچ شده ماهی می‌باشد درنتیجه، آبزی‌پروری 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 آبزی‌پروری 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 آبزی‌پروری نقش دارد. مطالعات زیادی در زمینه اثرات باکتریای گوناگون بر شاخص‌های زیستی *آرتمیا فرانسیسکانا* انجام شده است (Marques، ۲۰۰۶؛ Orozco-Medina، ۲۰۰۲؛ Verschuere، ۱۹۹۹). ایده استفاده از پروبیوتیک در یک دید وسیع را Moriarty (۱۹۹۷) پیشنهاد کرد که پروبیوتیک ها 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 وتشکیل 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 اسید لاکتیک 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 آبزی‌پروری پروبیوتیک‌ها به‌منظور کنترل بیماری‌ها، به‌صورت مکمل و یا حتی به‌عنوان جایگزینی برای ترکیبات ضدمیکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرند. مکانیسم عملکرد پروبیوتیک‌ها به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر آبزیان تأثیر می‌گذارند که شامل دفع رقابتی پاتوژن‌ها است، یعنی پروبیوتیک‌ها از طریق آنتی بیوزیس 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 وموجب بهبود رشد و بقاء در موجودهدف شوند (Jory، ۱۹۹۸).

پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌دلیل ویژگی آنتاگونیستی یا جلوگیری از تشکیل کلنی باکتری‌های بیماری‌زا، تحریک سیستم ایمنی طبیعی بدن و یا رهاسازی 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 دوّم می‌تواند همراه با لیزوزیم، به دفاع شیمیایی در مقابل پاتوژن بپردازد. این اوّلین 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 بسیارخوبی دربرداشته است لذا پرورش آرتمیا و تولید سیست آن می‌تواند کمک شایانی به صنعت آبزی پروری در کشور بنماید.

## مواد و روش‌ها

پروبیوتیک مورداستفاده باکتوسل (Bactocell ®, France) حاوی $10^{10}$ کلنی در گرم (CFU/gr) باکتری *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی*[1] می‌باشد. باکتوسل یک پروبیوتیک است که قادر به تولید اسیدلاکتیک می‌باشد. ترکیب این پروبیوتیک تجاری

[1] *Pediococcus acidilacticci*

شامل اسپورهای فعال باکتری‌های مذکور به‌میزان حداقل $۱۰^{۱۰}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم می‌باشد که در این آزمایش به‌عنوان باکتری‌های هدف در نظر گرفته شده است. در این آزمایش از سه سطح $۱۰^{۲}\times۱$ (تیمار اول)، $۱۰^{۴}\times۱$ (تیماردوم)، $۱۰^{۶}\times۱$ (تیمار سوم) باکتری به‌ازاء هر گرم غذا و تیمار شاهد (بدون پروبیوتیک) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به‌صورت 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 *آرتمیا فرانسیسکانا*، غذادهی، بررسی خصوصیات فیزیکو شیمیایی آب، بقای مولدین، تعداد ناپلی و تعداد سیست و غیره به‌صورت پیش آزمایش انجام گردید.

جهت اجرای آزمایش اصلی ۱۲ عدد مخزن ۶۰ لیتری آماده گردید که با ۴۰ لیتر آب آبگیری شد. مقدار ۵ گرم سیست *آرتمیا فرانسیسکانا* به ظروف مخروطی با حجم آب ۱ لیتر جهت تفریخ ریخته شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب محیط تفریخ و پرورش طبق استانداردهای اعلام شده درنظرگرفته شد (جدول ۱). خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب به‌صورت روزانه کنترل و ثبت می‌گردید.

**جدول۱: شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب محیط (انحرف معیار± میانگین) تفریخ سیست و پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا***

| محیط | شوری (گرم بر لیتر) | اکسیژن محلول (میلی‌گرم بر لیتر) | دمای آب (درجه سانتی‌گراد) | pH | روشنایی (لوکس) |
|---|---|---|---|---|---|
| تفریخ | ۳۵ | ۲/۵ ± ۲ | ۲۸ ± ۲ | ۸ ± ۰/۳ | ۲۰۰۰ |
| پرورش | ۶۰ | ۵ ± ۲ | ۲۳ ± ۲ | ۸ ± ۰/۳ | ۱۰۰۰ |

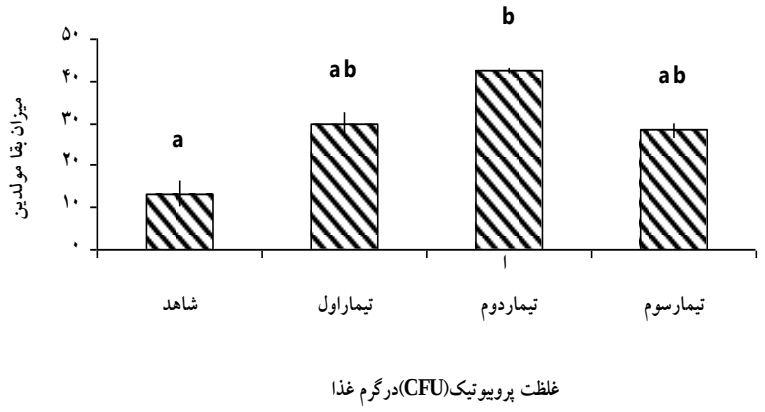
جهت تغذیه ناپلی *آرتمیا فرانسیسکانا* از مخمر نانوایی استفاده گردید (Lavens و Sorgeloos، ۱۹۹۶). غذای آرتمیا مخمر بود که داخل آب با شوری ۳۵ گرم در لیتر آب ۲۸ درجه حل شد (احمدنیای‌مطلق و همکاران، ۱۳۹۱)

پروبیوتیک باکتوسل به‌صورت 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 به‌منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی بدن انجام شد فعالیت لیزوزیم براساس لیزیز از حساسیت لیزوزیوم باکتری گرم مثبت *میکروکوکوس دکتیکوس* تعیین شده است (Neisse و همکاران، ۲۰۱۳). فعالیت Phenoloxidase (PO) با روش اسپکتروفتومتری با ثبت تشکیل dopachrome از dihydroxyphenylalanine-L (DOPA-L)، با توجه به‌روش ارائه شده توسط (Hernandez-Lopez و همکاران ۱۹۹۶) مورد سنجش قرار گرفت، فعالیت آنزیم Superoxide dismutase (SOD) با رعایت جلوگیری از کاهش ferricytochrome C و در آخر خواندن ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Cooper و همکاران، ۲۰۰۲). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در دو نسخه با استفاده از روش(Cohen وهمکاران ۱۹۷۰) با برخی تغییرات سنجش شد. میزان کلنی تشکیل شده باکتری *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* در دستگاه گوارش *آرتمیا فرانسیسکانا* نیز انجام شد زی‌توده آرتمیا بعد از جمع‌آوری توسط آب شیرین شسته و آبگیری 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 اسیدی‌لاکتیکی* نمونه آرتمیا به‌صورت 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 چنددامنه دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد و آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS انجام گردید.

## نتایج

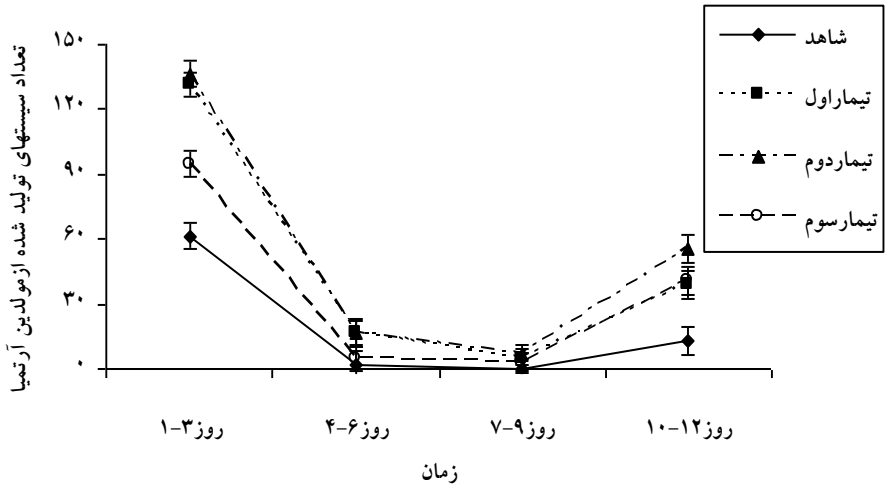
نتایج به‌دست آمده از تاثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococous acidilactici* بر میزان بقاء مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* در شکل ۱ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان بقاء در تیماردوم (۴۲/۵٪) مشاهده شد نتایج نشان داد که در طول دوره پرورش اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد وجود داشت (p<۰/۰۵).




**شکل ۱: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان بقاء مولدین آرتمیا فرانسیسکانا تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک (۱۰۲، ۱۰۴ و۱۰۶CFU درگرم‌غذا) درسه تکرار (P<۰/۰۵)**

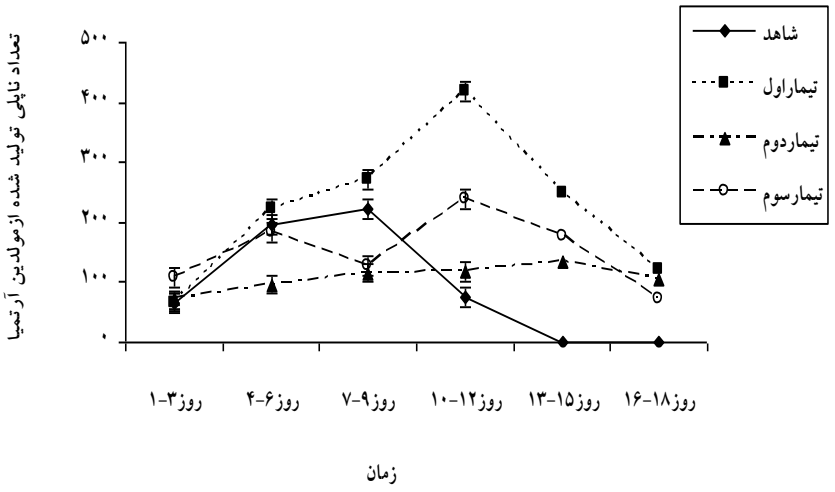
حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

تاثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococous acidilactici* بر مقدار سیست‌های تولیدشده توسط مولدین آرتمیا فرانسیسکانا در شکل ۲ دیده می‌شود بیش‌ترین مقدار کل تولید سیست (۲۱۵ عدد) مربوط به تیمار دوم ($۱۰^۴$ CFU در گرم غذا) بود. نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار درتیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد بود(P<۰/۰۵). اما تیمارهای اول و سوم علی‌رغم تولید سیست بیش‌تر اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان ندادند.



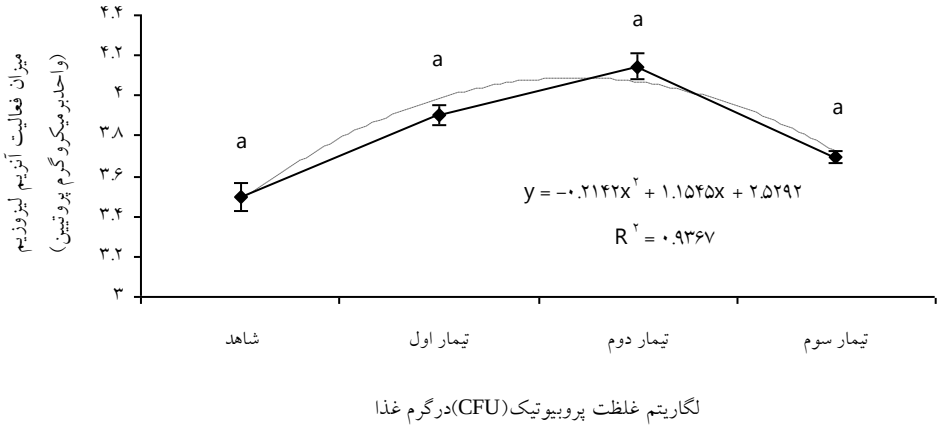

**شکل ۲: نمودار میانگین (± انحراف معیار) تعداد سیست حاصل از *مولدین آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^۲$، $۱۰^۴$ و $۱۰^۶$ CFU در گرم غذا) در سه تکرار (P<۰/۰۵)**

نتایج به‌دست آمده از تاثیر استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococous acidilactici* بر مقدار ناپلی تولید شده توسط مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* در شکل ۳ دیده می‌شود. در این ارتباط تعداد کل ناپلی تولید شده توسط آرتمیای تغذیه شده با $۱۰^{۲}$ CFU در گرم غذا، ۱۹۰۹ عدد بود که بیش‌ترین مقدار تولید ناپلی را داشت و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد را نشان داد (P<۰/۰۵). اما تیمارهای دوم و سوم با این‌که مقدار تولید ناپلی آن‌ها نسبت گروه شاهد بیش‌تر بود ولی اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند.




**شکل ۳: نمودار میانگین (± انحراف معیار) تعداد ناپلی حاصل از مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^{۲}$، $۱۰^{۴}$و $۱۰^{۶}$ CFU در گرم غذا) در سه تکرار (P<۰/۰۵)**

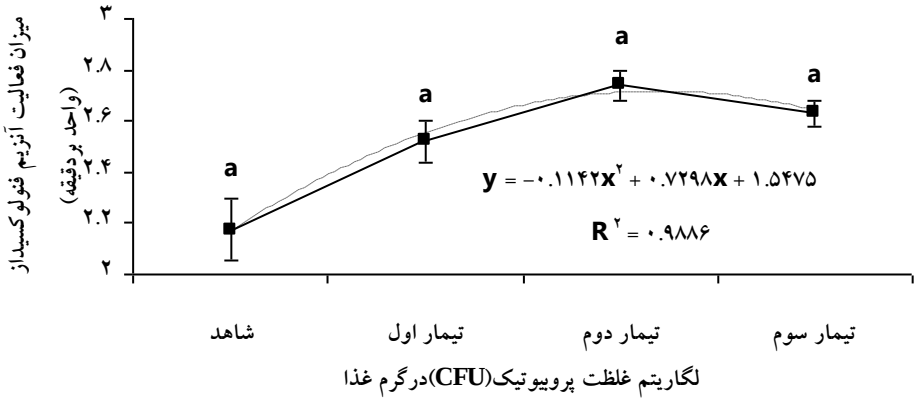
نتایج حاصل از تاثیر استفاده از سطوح مختلف باکتری *Pediococous acidilactici* بر میزان فعالیت آنزیم‌های ایمنی بدن آرتمیا فرانسیسکانا در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم ایمنی لیزوزیم در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد میزان لیزوزیم با زیاد شدن مقدار پروبیوتیک استفاده شده در غذای آرتمیا افزایش یافت و در تیمار سوم کاهش پیدا کرد ( شکل ۴).




**شکل ۴: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم حاصل از پرورش *آرتمیافرانسیسکانا* تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^{۲}$، $۱۰^{۴}$ و $۱۰^{۶}$CFU درگرم‌غذا) در سه تکرار (P<۰/۰۵).**

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

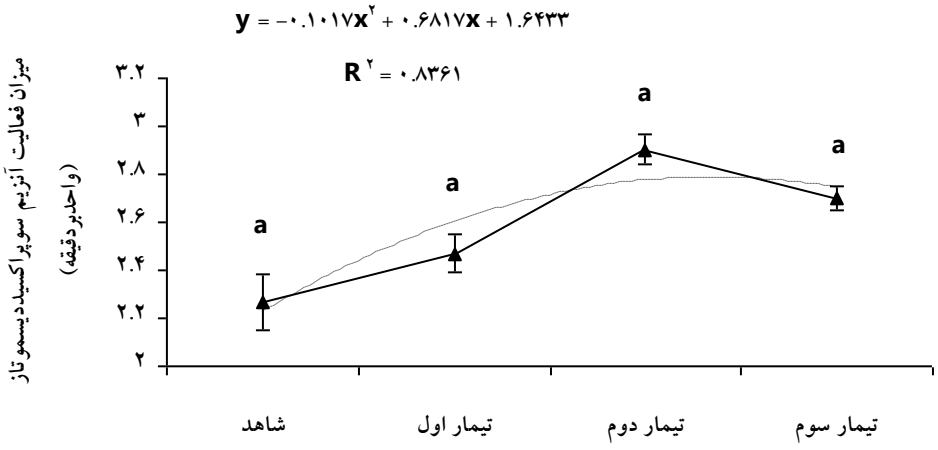
میزان فعالیت آنزیم ایمنی فنولوکسیداز (Phenoloxidase) (PO) درتیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (P<۰/۰۵). براساس نتایج این بررسی بیش‌ترین مقدار آنزیم فنولوکسیداز در تیمار دوم مشاهده گشت که با اضافه شدن پروبیوتیک در تیمار سوم مقدار آن کاهش یافت (شکل ۵).




**شکل ۵: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم فنولوکسیدازحاصل‌ازپرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^۲$، $۱۰^۴$ و $۱۰^۶$CFU در گرم غذا) درسه تکرار (P<۰/۰۵).**

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

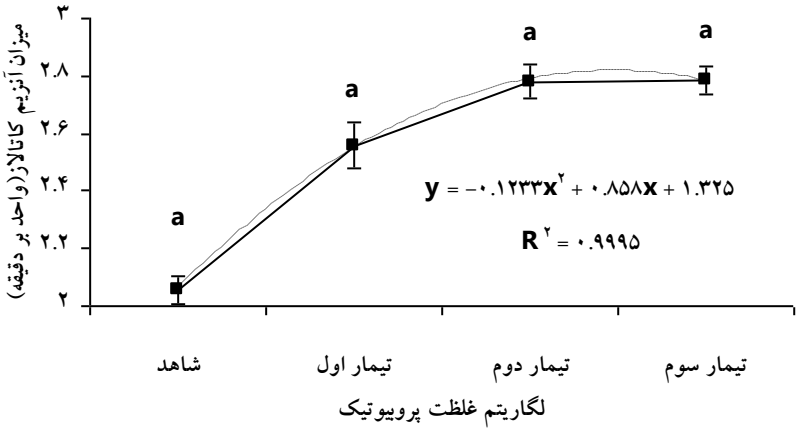
میزان فعالیت آنزیم ایمنی سوپراکسیددیسموتاز Superoxide dismutase (SOD) این مطالعه در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (P<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم SOD با افزایش مقدار پروبیوتیک زیاد شده و در تیمار سوم کاهش می‌یابد (شکل۶).




**شکل ۶: میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^۲$، $۱۰^۴$ و $۱۰^۶$CFU درگرم غذا) درسه تکرار(P<۰/۰۵).**

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

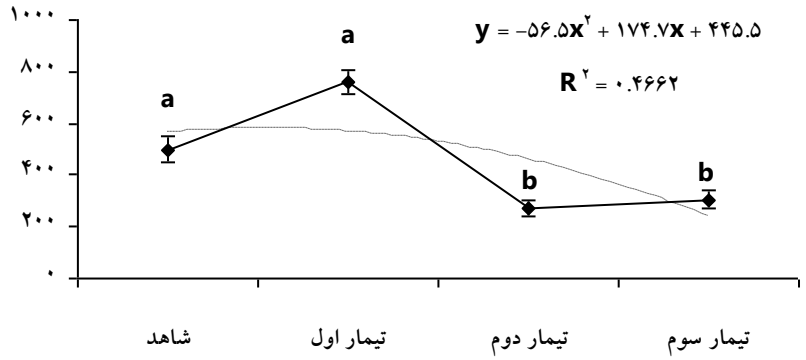
میزان فعالیت آنزیم ایمنی کاتالاز در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میزان فعالیت کاتالاز در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (P<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در با افزایش مقدار پروبیوتیک زیاد شده و در تیمار سوم بیش‌ترین مقدار را نشان داد ( شکل ۷).




**شکل ۷: نمودار میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^۲$، $۱۰^۴$ و $۱۰^۶$ CFU در گرم غذا) درسه‌تکرار (P<۰/۰۵).**

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

شمارش کلنی باکتری *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* تشکیل شده در محیط اختصاصی MRS در شکل ۸ نشان داده شده است. تعداد کلنی تشکیل شده در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند (P<۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار کلنی در تیمار اول شمارش شد.




**شکل ۸: نمودار میانگین (± انحراف معیار) تعدادکلنی MRS حاصل از پرورش *آرتمیا فرانسیسکانا* تغذیه شده با غلظت های مختلف پروبیوتیک ($۱۰^۲$، $۱۰^۴$ و $۱۰^۶$ CFU در گرم غذا) در سه تکرار (P<۰/۰۵).**

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 آبزی‌پروری 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 اسیدلاکتیکی* به محیط پرورش مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* باعث به‌وجود آمدن یک محیط پایدار شده و درصد بقاء مولدین را به‌طورمعنی‌داری 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 اسیدی 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 فرانسیسکانا* در تیمار دوم ($CFU10^4$ در گرم غذا) مشاهده گردید. به‌نظر می‌رسد وجود اختلاف معنی‌دار در تولید سیست به‌دلیل تاثیر پروبیوتیک *پدیوکوکوس اسیدلاکتیکی* در باروری بیش‌تر مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* 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 ودر 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 اسیدلاکتیکی* 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 $10^1$ CFU در گرم غذا می‌باشد، به‌نظر می‌رسد یک حالت رقابتی بین کل باکتری‌های دستگاه‌گوارش و باکتری *پدیوکوکوس‌اسیدلاکتیکی* 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 *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Clostridium* sp. در دستگاه گوارش میگو کاهش یافت (Moriarty، ۱۹۹۸).

تحقیقات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های زیست‌یار در آبزی‌پروری صورت گرفته و برخی از عملکردهای اثبات شده درخصوص 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 وتحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان ذکر کرد (Irianto و Austin، ۲۰۰۲).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان‌دهنده آن است که باکتری *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی* می‌تواند اثرات مطلوبی در تولید سیست وناپلی هم‌چنین بقای مولدین *آرتمیا فرانسیسکانا* داشته باشد در این تحقیق بیش‌ترین میزان بقاء مولدین هم‌چنین بیش‌ترین مقدار سیست تولید شده در تیمار دوم با سطح $1\times10^4$ CFU باکتری در گرم غذا به‌دست آمد که به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود. مقدار ناپلی تولید شده در تیمار اول با سطح $1\times10^2$ CFU باکتری در گرم غذا به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های آزمایشی بود. میزان

فعالیت آنزیم‌های ایمنی در تیمار دوم با سطح $1\times10^{4}$ 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 $1\times10^{2}$ 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 $1\times10^{2}$ CFU و سطح $1\times10^{4}$ CFU در گرم غذا برای *آرتمیا فرانسیسکانا* نتایج مطلوب‌تری خواهد داد.

## منابع


۱. **احمدنیای‌مطلق، 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 ارومیانا. نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۵، شماره ۲، صفحات ۹۹ تا ۱۰۸.

۲. **احمدنیای‌مطلق، 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 ارومیانا. 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. دوّمین 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 ارومیانا. مجله علمی شیلات ایران. شماره۳. صفحات ۵۵ تا ۶۰.

۵. **جعفریان، ح.، ۱۳۸۷.** توسعه آبزی‌پروری 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 واناژن) بر شاخص‌های رشد و بازماندگی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، اوّلین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فراویژه. تهران. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۷. **طالبی‌حقیقی، د.؛ فلاحی‌کپورچالی، م. و عبدالله‌تبار، 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.** Measurment 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-Martnez, 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.

24. **Stabilia, L.; Migliettab, A.M. and Belmonteb, 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.