جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۶، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۲

ارزیابی عملکرد ترکیب باسیلوس‌های پروبیوتیکی و مخمر ساکارومایسس سرویزیا ایزوله‌شده از دستگاه گوارش بچه‌ماهیان فیل‌ماهی، در ارتقای فاکتورهای رشد و بیوشیمیایی عصارهٔ بدن و افزایش مقاومت لارو ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) در مقابله با عوامل استرس‌زا

❖ **خیرالله خسروی کتولی***: گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **حجت‌الله جعفریان:** گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، ایران
❖ **داریوش عبداللهی:** گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، ایران
❖ **سجاد توانا:** گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، ایران

چکیده

مطالعهٔ حاضر با هدف تعیین تأثیرات ترکیب پروبیوتیکی: باسیلوس لیچنی فورمیس، باسیلوس سابتلیس، به همراه مخمر ساکارومایسس سرویزیا که از رودهٔ بچه‌ماهیان فیل ماهی جداسازی شدند، در فاکتورهای رشد و بیوشیمیایی حاصل از عصارهٔ بدن و میزان مقاومت لارو ماهی فیتوفاگ (با میانگین وزن ۱۰±۲۰۰ میلی‌گرم) در برابر عوامل استرس‌زای محیطی انجام شد. برای تغذیهٔ لاروها از غذای فرموله‌شدهٔ کپورماهیان استفاده شد. ماهیان گروه کنترل با جیرهٔ پایه و ماهیان ۳ گروه آزمایشی دیگر با جیرهٔ مکمل‌سازی‌شده با ۳ سطح $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ (جیرهٔ T۱)، ۳×۱۰^{۶} (جیرهٔ T۲) و $۴/۵ \times ۱۰^{۶}$ (جیرهٔ T۳) تغذیه شدند. نتایج نشان دادند که، بعد از ۳۰ روز تغذیه در تیمارهای مکمل‌سازی‌شده، پارامترهای رشد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند (P<۰/۰۵). تیمارهای T۲ و T۳ به طور معنی‌داری رشد بهتری را با ضریب تبدیل غذایی کمتر نسبت به گروه شاهد نشان دادند و نرخ رشد ویژه نیز در این تیمارها بهترین عملکرد را داشت. همچنین، نتایج نشان دادند که میزان لیپاز در هر ۴ گروه آزمایشی تغییر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). میزان آمیلاز به ترتیب در تیمارهای T۲ و T۳ و میزان قند در تیمار T۳ بیشترین میزان خود را داشتند؛ میزان کورتیزول نیز در تیمار شاهد به صورت معنی‌داری نسبت به گروه‌های پروبیوتیکی بیشتر بود (P<۰/۰۵). لاروهای تغذیه‌شده با جیرهٔ حاوی ترکیب پروبیوتیکی مقاومت بیشتری در برابر شرایط نامساعد محیطی در مقایسه با تیمار کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵). نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیکی در مکمل‌سازی غذا می‌تواند در فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن و میزان مقاومت لارو ماهی فیتوفاگ در اکثر موارد تأثیرگذار باشد.

واژگان کلیدی: ترکیب پروبیوتیکی، فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن، لارو ماهی فیتوفاگ، مقاومت.

* نویسندهٔ مسئول: تلفن: ۰۹۸۹۱۱۲۷۸۴۹۱۳+ Email: khosravi.kh@ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱. مقدمه

پرورش کپورماهیان در ایران از نظر اقتصادی مهم است، اما میزان بقا در دوران لاروی به علل مختلف کاهش پیدا می‌کند (Bagheri *et al.*, 2008). موفقیت‌ها و شکست‌های برنامه‌های پرورش ماهی وابستگی بسیاری به شرایط پرورشی اولیهٔ لارو ماهیان دارد. با توجه به اهمیت تأمین پروتئین جامعه همچنین، ارزش غذایی پروتئین آبزیان، باید این امکان فراهم شود که آبزیان به میزان بیشتری در دسترس افراد جامعه قرار بگیرند. یکی از گونه‌هایی که پرورش آن از نظر اقتصادی برای پرورش‌دهنده مقرون به صرفه است، ماهی فیتوفاگ است که علت آن نیز نوع تغذیهٔ صافی‌خواری این گونه است. همان طور که در بالا نیز اشاره شد برای آبزی‌پروری موفق، رشد اولیهٔ لاروها خیلی بااهمیت است و در صورتی که این نیاز اساسی مرتفع نشود، ماهیان بالغ حاصل طی دورهٔ پرورش با مشکلاتی از جمله کاهش رشد و کاهش میزان مقاومت نسبت به شرایط محیطی و عوامل بیماری‌زا مواجه می‌شوند. استفاده از مکمل‌سازی جیره با ویتامین‌ها، پروبیوتیک‌ها و محرک‌های سیستم ایمنی می‌تواند به‌منزلهٔ راهکاری مناسب در مورد این گونه‌ها به کار گرفته شود (Jalali *et al.*, 2009). دربارهٔ استفاده از ترکیب پروبیوتیکی در لاروهای این گونه اطلاعاتی در دسترس نیست.

باسیلوس‌ها و مخمرها به‌منزلهٔ مکمل غذایی در موجودات مختلف استفاده شده‌اند. Noh *et al.* (1994) و Bugot *et al.* (1998) نیز اثبات کردند که پروبیوتیک‌های تجاری تهیه‌شده از باکتری استرپتوکوکوس فاسیوم (*Streptococcus faecium*)، طی مکمل‌سازی با جیره‌های ماهی کپور، موجب بهبود کارآیی تغذیه و رشد در آنها شدند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که مخمر ساکارومایسس سرویزیا و باکتری‌های باسیلوس می‌توانند باعث افزایش مقاومت در ماهیان شوند (Ortuno *et al.*, 2002). آزمایش مقاومت در برابر تنش به منظور برآورد وضعیت فیزیولوژیکی لاروهای در حال رشد و بررسی تأثیرات مفید مواد افزودنی در مقاومت ماهی در برابر شرایط نامساعد محیطی است (Dehert *et al.*, 1992). اصول این آزمایش‌ها بر قراردادن لاروها در معرض یک وضعیت نامتعادل فیزیکی، شیمیایی یا زیستی و در یک دورهٔ زیستی کوتاه استوار است (Ako *et al.*, 1994). این مطالعات با اندازه‌گیری مقاومت لاروها و بررسی میزان بازماندگی آنها در مقابل تنش ایجادشده کامل می‌شود. از طریق این آزمایش می‌توان تأثیر مواد غذایی تغذیه‌شده در مقاومت ماهی و در نهایت کیفیت لاروهای تولیدی را مشخص کرد. در چندین مطالعه نشان داده شده است که جیره‌های حاوی پروبیوتیک می‌توانند باعث تأثیر در فاکتورهای بیوشیمیایی خون شوند (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008; Andrews *et al.*, 2009) و به‌منزلهٔ شاخصی در دسترس برای سلامت آبزیان‌اند. طی دههٔ اخیر جوامع میکروبی، به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیکی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند؛ ما نیز برای فهم چگونگی تغییر فعالیت‌های هضمی، توسعهٔ ایمنی و مقاومت به بیماری گام‌هایی برداشته‌ایم.

بنابراین، مطالعهٔ حاضر با هدف تعیین تأثیر ترکیب پروبیوتیکی در فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن و میزان مقاومت در لاروهای فیتوفاگ تغذیه‌شده با مکمل پروبیوتیکی انجام گرفته است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. انتخاب و جداسازی فلور میکروبی از رودهٔ ماهی

از بچه‌ماهیان سالم فیل‌ماهی (*Huso huso*) تعداد ۲۰ قطعه انتخاب و پس از ۲۰ ساعت گرسنگی در عصارهٔ گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شدند. برای رفع باکتری‌های سطح بدن لاروها، نمونه‌های ماهی در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفتند (Makridis *et al.*, 2001) سپس، با آب مقطر استریل کاملاً شست‌وشو شدند. ناحیهٔ شکمی لاروها با استفاده از تیغ جراحی استریل شکافته شد و رودهٔ آنها، پس از جداسازی، به منظور هموژن‌سازی به هاون چینی استریل منتقل شد. پس از تهیهٔ هموژن، با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل (۰/۸۷ w/v Nacl درصد)، رقت‌های سریالی در دامنهٔ ۱–۱۰ تا ۸–۱۰ تهیه شدند. از رقت‌های فوق تحت شرایط استریل با نمونه‌بردار حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به پلت حاوی محیط‌های کشت باسیلوس سرئوس آگار و تریپتیک سوی آگار منتقل و در سطح آن پخش شدند (Rengpipat *et al.*, 1998). پلت‌های فوق به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۰°C انکوباسیون شدند و پرگنه‌های تشکیل‌شده مجدداً در محیط کشت تریپتیک سوی آگار به صورت خالص کشت شدند.

سرانجام، در آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران، بر اساس مشخصات فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد، میکروفلورهای مورد نظر جداسازی سپس، در محیط کشت تریپتیک سوی براث، به صورت خالص کشت داده شدند (Kapetanovic *et al.*, 2005). شایان ذکر است که هر ۳ پروبیوتیک استفاده‌شده در این مطالعه حاصل پایان‌نامهٔ دهقان (۱۳۹۰) است که مختصری از شرح استخراج آنها در فوق آمده است.

۲.۲. مکمل‌سازی جیره‌ها

جیرهٔ پایه‌ای به‌کار رفته از کارخانهٔ خوراک دام و آبزیان ساری تهیه شد. آنالیز غذا در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. آنالیز غذای پایه (بر اساس درصد مادهٔ خشک) که برای تغذیهٔ لاروهای ماهی فیتوفاگ از آن استفاده شد

انرژی خام (کالری بر گرم)	خاکستر (درصد)	چربی خام (درصد)	پروتئین خام (درصد)	مادهٔ خشک (درصد)
۴/۵	۱۰	۸	۴۲	۸۸

جیره‌های آزمایشی در ۳ سطح مختلف از مخلوط پروبیوتیکی تهیه شدند. روش کار به این صورت بود که آنس پس از ضدعفونی روی محیط کشت حاوی میکروارگانیسم مورد نظر کشیده و مقداری از کلنی‌ها برداشته شد؛ سپس، درون اپندرف‌هایی قرار گرفتند که درونشان سرم فیزیولوژیک بود؛ این کار برای هر ۳ میکروارگانیسم انجام گرفت؛ سپس، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل بیوکروم[1] و محلول استاندارد مک فارلند نیم، غلظت مورد نظر در هر میکروارگانیسم به دست آمد که برابر با $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ بود؛ در ادامه، هر ۳ محلول شامل ۳ میکروارگانیسم (پروبیوتیک‌ها) در سطوح مختلف که عبارت بودند از $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ (جیرهٔ T۱)، ۳×۱۰^{۶} (جیرهٔ T۲) و $۴/۵ \times ۱۰^{۶}$ (جیرهٔ T۳) به ۱۰۰ گرم غذا اضافه شدند. به جیرهٔ شاهد (C) هیچ نوع مکمل پروبیوتیکی اضافه نشد.

1. Biochrom-Libra S22

۳.۲. طراحی آزمایش

۳ تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد، هر یک با ۳ تکرار، برای این آزمایش در نظر گرفته شدند. تعداد ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاسی با حجم آب‌گیری ۶ لیتر انتخاب شدند. لارو ماهی فیتوفاگ با وزن ۲۰۰ میلی‌گرم، به تعداد ۴۰ قطعه (با تراکم ۶-۷ قطعه ماهی در هر لیتر) به هر تانک معرفی شدند. هوادهی مستمر با دستگاه پمپ الکتریکی هوا مدل «هایلا» صورت می‌گرفت. لاروهای ماهی در تیمارهای آزمایشی T۱، T۲ و T۳ به ترتیب از جیره‌های آزمایشی دارای مخلوط پروبیوتیکی با غلظت گرم/ $۱۰^{۶}$CFU × ۱/۵، گرم/CFU $۱۰^{۶}$ ×۳ و گرم/CFU $۱۰^{۶}$ × ۴/۵ تغذیه شدند. در تیمار شاهد لاروهای فیتوفاگ از جیرهٔ بدون مخلوط پروبیوتیکی تغذیه شدند.

۴.۲. تغذیهٔ لاروهای فیتوفاگ

مقدار غذای مورد نیاز لاروهای فیتوفاگ به ازای هر روز بر اساس جدول استاندارد (وزن توده ماهی و درجهٔ حرارت آب) تعیین و در هر یک از تیمارهای آزمایشی به آنها خورانده شد. باقیماندهٔ غذایی نیز از طریق سیفون‌کردن با دقت از مخازن فایبرگلاسی جمع‌آوری شد. این مقدار غذای جمع‌آوری‌شده از کل غذای عرضه‌شده کسر شد و غذای خورده‌شدهٔ روزانه محاسبه شد (Ghosh *et al.*, 2003).

۵.۲. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب

طی دورهٔ آزمایش برخی از معیارهای کیفی آب از جمله اکسیژن محلول و درجهٔ حرارت آب روزانه اندازه‌گیری شدند که به ترتیب عبارت بودند از: ۰/۶۵±۷/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱/۱۲±۲۲/۵ درجهٔ سانتی‌گراد. رژیم نوری نیز به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود.

۶.۲. معیارهای رشد

به منظور تعیین مقدار غذای روزانهٔ لاروهای ماهی فیتوفاگ به فاصلهٔ زمانی هر ۷ روز، از لاروهای ماهی هر تکرار، تعداد ۱۰ قطعه نمونه‌برداری شد و پس از بی‌هوش‌کردن آنها، در محلول عصارهٔ گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن و طول آنها با استفاده از ترازوی دیجیتالی، با دقت ۰/۰۱ گرم و کولیس ۰/۱ میلی‌متر، اندازه‌گیری شد. همچنین، در پایان دورهٔ آزمایش نیز تمامی لاروهای ماهی هر حوضچه پس از بی‌هوش‌سازی به طور جداگانه بیومتری شدند.

۷.۲. تست مقاومت

در پایان دورهٔ غذادهی، برای بررسی تأثیرات این میکروارگانیسم‌ها در مقاومت ماهی در شرایط نامساعد محیطی، ۴ محیط استرس‌زا برای دادن شوک به لاروها آماده شدند که شامل شوک بازی (PH=۱۲)، شوک اسیدی (PH=۲)، شوک دمایی (۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد) و شوک آمونیاک (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند (Jafaryan *et al.*, 2009). محدوده و غلظت هر کدام از عوامل استرس‌زا برای مدت زمان ۱۰ دقیقه (میانگین زمان مقاومت لارو) مشخص شد. بدین صورت که نخست، تعداد ۵ ماهی از هر تکرار در این مدت زمان برای آزمایش‌های مختلف انتخاب شدند.

بعد از مشخص‌کردن این مقادیر، لاروها در هر تکرار به طور مجزا در مخازنی شامل محیط استرس‌زا (اسیدی، بازی، دما و آمونیاک) قرار گرفتند و میزان زمان زنده‌مانی لارو موجود در تانک به‌منزلهٔ میزان مقاومت لاروها در آن مشخص شد. میزان زنده‌مانی

لاروها در این مطالعه بر حسب ثانیه تعیین و تعداد ۵ لارو نیز به طور تصادفی از هر مخزن انتخاب شد.

۸.۲. شیوهٔ نمونه‌برداری

اثر پروبیوتیک در پارامترهای رشد و مقاومت، به تنش در لارو فیتوفاگ از هر حوضچه در انتهای آزمایش منجر شد. اطلاعات اولیهٔ زیست‌سنجی در روز شروع آزمایش از ۱۰۰ قطعه لارو به دست آمد که از جمعیت لاروها به طور تصادفی انتخاب شده بودند.

۹.۲. آنالیز بیوشیمیایی عصارهٔ بدن

به منظور تعیین تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون در لاروها به علت کوچکی اندازهٔ آنها و ناتوانی در خون‌دهی، از روش همگن‌کردن کل بدن آنها استفاده شد (Postlethwaite and Mcdonald, 1995; Prodocimo *et al*., 2007). همهٔ لاروها در دستگاه هموژنایزر له شدند سپس، بدن له‌شدهٔ لاروها به میکروتیوپ‌ها انتقال پیدا کرد و بعد درون دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه قرار گرفتند (Postlethwaite and Mcdonald, 1995). بعد از خروج مایع قسمت فوقانی میکروتیوپ، که همان عصارهٔ بدن است، برای آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی به آزمایشگاه منتقل شدند. اندازه‌گیری هورمون کورتیزول با استفاده از کیت سنجش هورمون کورتیزول به روش ELISA مستقیم انجام شد (Deane and Woo., 2003). فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن نیز با استفاده از آنالیزکنندهٔ خودکار (Eppendorf, EPOS, Germany) اندازه‌گیری شدند (Hoseinifar *et al*., 2011b).

۱۰.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های زیست‌سنجی ماهیان و معیارهای رشد محاسبه‌شده، در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام پذیرفت.

۳. نتایج

عملکرد رشد در لاروهای فیتوفاگ که از جیره‌های آزمایشی تغذیه کرده بودند در جدول ۲ نمایش داده شده است. لاروهایی که در تیمار T۲ و T۳ قرار داشتند از لحاظ وزن نهایی بدن و نرخ رشد ویژه به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تیمار شاهد بیشتر بودند. ضریب تبدیل غذایی در هر ۳ تیمار آزمایشی که با پروبیوتیک تغذیه شده بودند در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود و این کاهش در دو تیمار T۲ و T۳ به صورت محسوسی بیشتر از گروه شاهد بود. آنالیز ترکیب لاشهٔ بدن لاروها در جدول ۳ نشان داده شده است. چربی خام و انرژی خام در تیمار T۳، خاکستر در تیمار T۱ و پروتئین خام به ترتیب در تیمارهای T۲ و T۳ بیشترین مقدار را نشان دادند؛ الیاف خام و مادهٔ خشک نیز در هیچ کدام از گروه‌ها تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). تأثیر مخلوط پروبیوتیکی در فاکتورهای بیوشیمیایی بدن در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری نشان داد که میزان لیپاز در هیچ‌کدام از تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (P>۰/۰۵)، اما میزان آمیلاز در تیمار T۲ و بعد تیمار T۳ نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد (P<۰/۰۵) و میزان قند نیز در تیمار T۳ بیشترین مقدار بود که نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری داشت. سطح کورتیزول نیز در تیمار شاهد به طور معنی‌داری از همهٔ تیمارهای آزمایشی بیشتر بود (P<۰/۰۵) و بعد از آن به ترتیب تیمارهای T۱، T۲ و T۳ مشاهده شدند.

جدول ۲. تأثیر جیرهٔ مکمل‌سازی‌شده با ترکیب پروبیوتیک در فاکتورهای رشد لارو ماهی فیتوفاگ

تیمار / پارامتر	شاهد	تیمار ۱ ۱/۵×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۲ ۳×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۳ ۴/۵×۱۰^۶ CFU/g
وزن اولیه (mg)	۲۰۰±۱۵^a	۲۰۰±۱۵^a	۲۰۰±۱۵^a	۲۰۰±۱۵^a
وزن نهایی (mg)	۲۳۸/۰۱±۲۴/۷۴^b	۲۴۷/۱۴±۶/۱۶^ab	۲۶۷/۹۴±۱۱/۶۲^a	۲۷۱/۷۴±۸/۹۵^a
ضریب تبدیل غذایی[1]	۲/۲۶۷±۰/۰۹۲^a	۲/۱۶۸±۰/۰۵^ab	۲/۰۱±۰/۰۸۹^b	۱/۹۷۳±۰/۰۶۵^b
نرخ رشد ویژه[2]	۰/۵۱۶±۰/۱۱۴^b	۰/۶۴۱±۰/۰۷۵^ab	۰/۸۸۴±۰/۱۳۳^a	۰/۹۲۸±۰/۰۱^a

حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانهٔ معنی‌داربودن است (P <۰/۰۵).

ضریب تبدیل غذایی۱= مقدار غذای خورده‌شده (میلی‌گرم) /وزن به‌دست‌آمده (میلی‌گرم)

نرخ رشد ویژه۲= [لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی- لگاریتم اولیهٔ ماهی /دورهٔ پرورش (روز)] × ۱۰۰

جدول ۳. ترکیب لاشه (بر اساس درصد وزن مادهٔ خشک) در لاروهای ماهی فیتوفاگ که با جیرهٔ مکمل‌سازی‌شده با ترکیب پروبیوتیکی تغذیه شده‌اند

تیمار / پارامتر	شاهد	تیمار ۱ ۱/۵×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۲ ۳×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۳ ۴/۵×۱۰^۶ CFU/g
پروتئین خام (درصد)	۷۰/۰۳±۱/۵۴a	۷۱/۸۸±۱/۶۲ab	۷۲/۸۵±۰/۶۰b	۷۲/۷۱±۱/۰۱b
انرژی خام (ژول)	۴۵۴۷/۷۴±۲۶/۴۲^ab	۴۴۳۶/۰۴±۳۱/۸۰^a	۴۵۴۹±۳۵/۲۴^ab	۴۶۰۴/۸۱±۳۱/۹۹^b
چربی خام (درصد)	۱۰/۰۹±۰/۷۴^a	۱۰/۲۱±۰/۲۶^a	۱۱/۰۸±۰/۵۶^ab	۱۲/۰۶±۰/۵۹^b
خاکستر (درصد)	۱۱/۶۲±۰/۹۷^ab	۱۲/۵۸±۱/۰۳^b	۱۱/۵۸±۱/۳۱^ab	۱۰/۱۲±۰/۴۰^a
مادهٔ خشک (درصد)	۱۴/۵۱±۲/۰۳^a	۱۵/۵۲±۲/۱۵^a	۱۵/۷۹±۱/۳۴^a	۱۳/۹۷±۲/۷۱^a

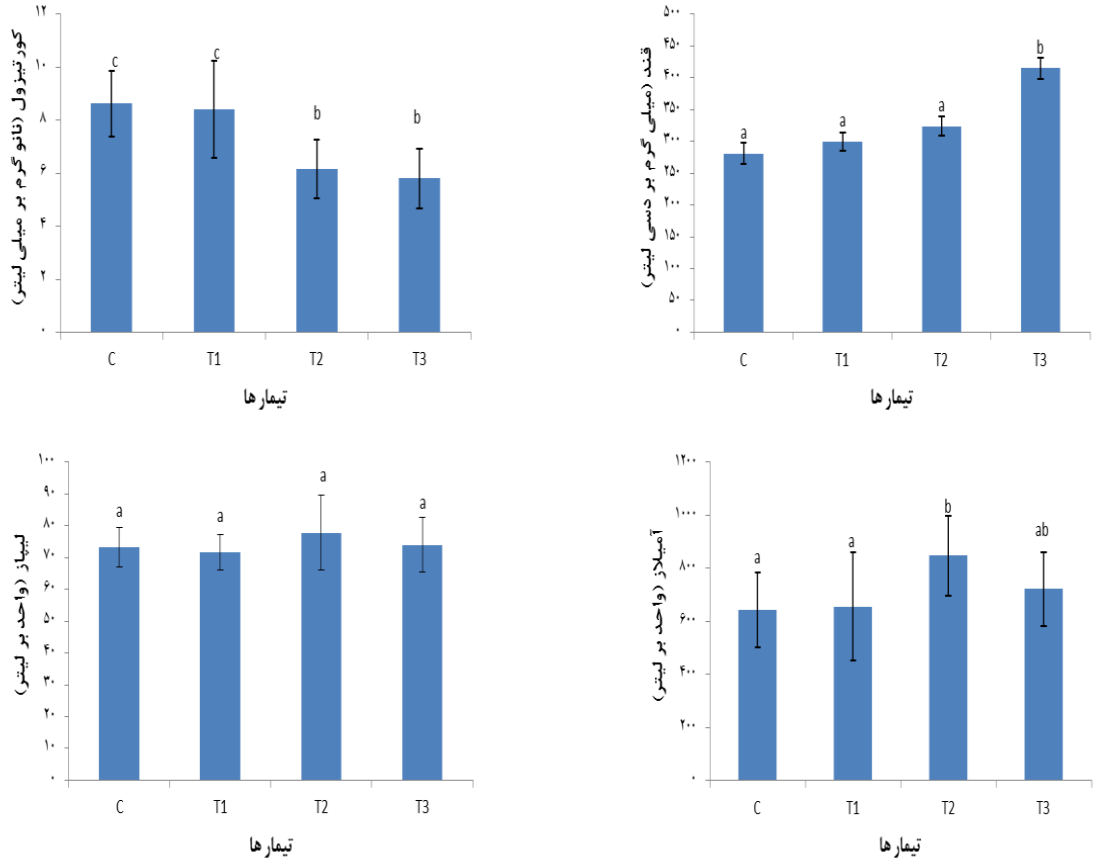
حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانهٔ معنی‌داربودن است (P<۰/۰۵).

مقاومت لاروهای فیتوفاگ در برابر شرایط استرسی در جدول ۴ نشان داده شده است. استفاده از مخلوط پروبیوتیکی نقش مؤثری در افزایش مقاومت لاروها در برابر شرایط استرسی داشت. به طوری که، لاروهای تغذیه‌شده با این ترکیب توانستند به طور معنی‌داری در برابر این شرایط نسبت به گروه شاهد مقاومت کنند (P<۰/۰۵). بیشترین مقاومت و زنده‌مانی لاروها در تیمارهای T۲ و T۳ مشاهده شد.

جدول ۴. ارزیابی زمان زنده‌مانی در لارو ماهی فیتوفاگ تغذیه‌شده با جیرهٔ مکمل‌سازی‌شده با ترکیب پروبیوتیکی در برابر شرایط استرس‌زا (بر حسب ثانیه)

تیمار / پارامتر	شاهد	تیمار ۱ ۱/۵×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۲ ۳×۱۰^۶ CFU/g	تیمار ۳ ۴/۵×۱۰^۶ CFU/g
۳ PH	۳۸۴/۰۰±۴۰/۷۷^a	۵۱۴/۳۳±۷۲/۷۷^ab	۵۶۸/۳۳±۷۷/۵۱^bc	۶۳۵/۰۰±۴۲/۷۲^c
NH3	۲۱۵/۳۳±۱۷/۴۷^a	۳۰۹/۳۳±۹۱/۷۹^ab	۳۴۴/۳۳±۵۱/۰۵^b	۲۶۶/۳۳±۲۲/۵۴^ab
۱۲ PH	۳۶۹/۶۶±۱۰/۵۰^a	۳۹۹/۶۶±۱۷/۰۳^ab	۴۰۳/۳۳±۶/۶۵^ab	۴۳۷/۶۶±۱۶/۴۴^c
دما ۴۰°C	۶۱/۰۰±۱/۷۳^a	۶۴/۶۶±۴/۷۲^a	۱۴۱/۳۳±۴۰/۱۵^b	۱۲۷/۳۳±۵۲/۲۱^b

حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانهٔ معنی‌داربودن است (P<۰/۰۵).



شکل ۱. تأثیر مخلوط پروبیوتیکی در فاکتورهای بیوشیمیایی بدن در فاکتورهای کورتیزول، آمیلاز، قند و لیپاز

۴. بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی‌اند که باعث افزایش رشد و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها معمولاً، به‌منزلهٔ ماده‌ای افزودنی به غذا، به مصرف موجود می‌رسند و آثار مفیدی در تعادل میکروبی روده دارند. استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری با اهداف مختلفی از جمله به‌منزلهٔ عامل محرک در بهبود پارامترهای رشد و نرخ بازماندگی آبزیان به کار رفته است (Verschuere *et al.*, 2000). استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌های ایزوله‌شده از دستگاه گوارش بچه‌ماهیان خاویاری باعث عملکرد بالای رشد لاروهای ماهی فیتوفاگ بود. در همین خصوص، بیان شده است که باسیلوس‌های ایزوله‌شده از کانال گوارشی لاروهای پرورشی تأثیر بسیار بالایی را نسبت به باسیلوس‌های تهیه‌شده به صورت تجاری دارند (Ghosh *et al.*, 2002). همچنین، تحقیقات نشان داد که پتانسیل باسیلوس‌های زیست‌یار ایزوله‌شده از ماهیان پرورشی در ارتباط با فعالیت‌های متابولیکی نظیر فعالیت‌های لیپولیتیک، آمیلولیتیک و پروتئولیتیک بالاست و نسبت به باکتری‌های زیست‌یار تجاری از توانایی تأثیرگذاری بیشتری در افزایش معیارهای رشد و تغذیه و ارتقای نرخ بقا در ماهیان پرورشی برخوردارند (Bairagi *et al.*, 2002). در مطالعه‌ای که Bagheri *et al.* (2008) انجام دادند، از باکتری‌های

باسیلوس لیچنیفورمیس و سابتیلیس، به‌منزلهٔ ترکیب پروبیوتیکی، برای افزایش رشد و بقا در فرای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کردند؛ همچنین، در مطالعاتی از مخمر ساکارومایسس سرویزیا نیز به‌منزلهٔ پروبیوتیک در آبزی‌پروری استفاده شده است (Chiu *et al*., 2010; Lara-Flores *et al*., 2003).

در این مطالعه تأثیر استفاده از مخلوط پروبیوتیکی در برخی از فاکتورهای رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم بدن و میزان مقاومت لاروهای فیتوفاگ به استرس‌های محیطی بررسی شد. میزان وزن به‌دست‌آمده، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی طی دوره و در گروه‌هایی که از جیره‌های حاوی پروبیوتیک تغذیه کرده بودند ارتقا پیدا کردند (جدول ۲). نتایج مشابهی دربارهٔ افزایش فاکتورهای رشد در تغذیه از پروبیوتیک‌ها در مطالعات قبلی به دست آمده است (Bagheri *et al*., 2008 ; Gosh *et al*., 2002a). در مشابهت با نتایج این تحقیق، باسیلوس‌های پروبیوتیکی طی جایگزین‌شدن در رودهٔ لاروهای ماهی در هضم و جذب بهتر غذا نقش مثبتی را ایفا کردند و باعث افزایش رشد شدند (Ghosh *et al*., 2003). همچنین، در مطالعه‌ای که Jafaryan *et al*. (2009) انجام دادند، از ترکیب ۳ پروبیوتیک (باسیلوس پلی میکسا و باسیلوس سیرکولانس و مخمر نانوایی) در مکمل‌سازی غذای لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نتایج مشابهی حاصل شده بود. در تحقیق حاضر پروبیوتیک‌های باسیلی به‌خوبی توانستند ضریب تبدیل غذایی را کاهش و کارآیی تبدیل غذایی را در حد معنی‌داری افزایش دهند که در پرورش لارو ماهی قزل‌آلا یکی از اهداف مهم تلقی می‌شود. در این خصوص، باسیلوس‌های پروبیوتیکی تأثیر بسیار موفقیت‌آمیزی از خود نشان دادند، اما در مطالعاتی نیز بی‌تأثیری پروبیوتیک‌هایی مثل مخمر در فاکتورهای رشد به دست آمده است (Tovar-Ramirez *et al*., 2004; Li *et al*., 2005). برای اینکه تعیین شود علت تناقض این نتایج با یافته‌های قبلی چیست؟ باید تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود، اما می‌توان احتمال داد که علت مشاهدهٔ این نتایج، اختلافات گونه‌ای یا اختلاف در چگونگی استفاده از این پروبیوتیک در غذا باشد. همچنین، در این مطالعه تأثیر مخلوط پروبیوتیکی در آنالیز لاشه نشان داد که این مکمل می‌تواند در میزان ترکیبات مختلف لاشهٔ لارو ماهیان فیتوفاگ مؤثر باشد (جدول ۳). به طوری که، میزان پروتئین و چربی در تیمارهای تغذیه‌شده با جیرهٔ حاوی مخلوط پروبیوتیکی به طور درخور ملاحظه‌ای افزایش یافت.

پارامترهای بیوشیمیایی موجود در خون شاخص باارزشی برای نظارت بر سلامت ماهی‌ها و پاسخ‌های فیزیولوژیکی تغذیه‌اند (Cannani *et al*., 2008). مطالعهٔ حاضر نشان داد که اختلاف معناداری ($P<۰/۰۵$) بین برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن (آمیلاز، قند و کورتیزول) موجود در گروه‌های پروبیوتیکی با گروه شاهد وجود دارد (شکل ۱). در مشابهت با نتایج، Abdel-Tawwab *et al*. (2008) مشاهده کردند که میزان پروتئین و گلوکز موجود در سرم بدن ماهی تیلاپیا، که با مخمر تغذیه شده بود، افزایش پیدا کرده است.

همچنین، پروبیوتیک‌ها علاوه بر کمک به بهبود پارامترهای رشد می‌توانند با تولید متابولیت‌ها سبب افزایش ایمنی و مقاومت لارو در برابر شرایط استرس‌زا شوند. استفاده از مخلوط ۳ پروبیوتیک در این آزمایش هم نتایج مفیدی را دربارهٔ تأثیرات مثبت پروبیوتیک در بقا و زنده‌مانی لاروها به دنبال داشته

است (جدول ۴). در تأیید نتایج افزایش میزان مقاومت در تیمارهای پروبیوتیکی، میزان کورتیزول موجود در عصارهٔ بدن (شکل ۱) افزایش پیدا کرده است، این در حالی است که این هورمون شاخص استرس در موجودات است (Rollo *et al.*, 2006) و در تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک‌ها نیز در مقایسه با گروه شاهد سطح آن کمتر است. در استفاده از باسیلوس‌ها برای افزایش مقاومت در ماهیان، در برابر عوامل تنش‌زا، نتایج مشابهی در مطالعهٔ Rollo *et al.* (2006) مشاهده شد. آنها به این نتیجه رسیدند که این باکتری‌ها موجب کاهش تلفات در باس دریایی می‌شوند که از باسیلوس‌ها تغذیه شده‌اند؛ همچنین، میزان کورتیزول نیز در آنها کاهش معنی‌داری نشان داده بود. از طرفی، مخمر نیز حاوی موادی مانند بتاگلوکان و نوکلئوتید است که تا حد زیادی سبب مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Sahoo and Mukherjee, 2001).

نتایج این تحقیق در ادامهٔ تحقیقات متعدد انجام‌شده دربارهٔ کارایی پروبیوتیک‌ها در افزایش بازدهی در صنعت آبزی‌پروری نشان داد که عوامل بیولوژیک، مانند باکتری‌های سابتلیس و لیچنی فورمیس همچنین مخمر ساکارومایسس سرویزیا، می‌توانند قابلیت‌های نسبتاً بالا و بسیار ارزشمندی در ارتقای عملکرد رشد، بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی عصارهٔ بدن همچنین، افزایش مقاومت لاروهای ماهی فیتوفاگ در برابر شرایط نامساعد محیطی داشته باشند و در مراکز تکثیر و پرورش به‌منزلهٔ فناوری نوین زیستی بهره‌برداری شوند.

References

[1]. Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael, N., 2008. Evaluation of commercial live baker's yeast, Saccharomyces cerevisiae as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with Aeromonas hydrophila. Aquaculture 280, 185–189.

[2]. Ako, H., Tamaru, C.S., Bass, P., Lee, C.S., 1994. Enhancing the resistance to physical stress in larvae of *Mugil cephalus* by the feeding of enriched Artemia naupli. Aquaculture 122, 81- 90.

[3]. Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S., 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research 41, 61–69.

[4]. Bagheri,T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizadeh, M., Farzanfar, A., 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout fry given diet supplemented with probiotic during the two month of first feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science 8, 43-48.

[5]. Bairagi, A., Sarkar Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10, 109-12.

[6]. Bogut, I., Milakovic, Z., Bukvic, Z., Brkic, S., Zimmer, R., 1998. Influence of probiotic *Streptococcus faecium* M74 on growth and content of intestinal microfolora in carp cyprinus carpio. Czech Journal of Animal Science 43, 231-235.

[7]. Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K., Cheng, W., 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, Epinephelus coioides. Fish and Shellfish Immunology 29, 1053–1059.

[8]. Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., Hulata, G., 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. Aquaculture Research 35, 1434–1440.

[9]. Deane, E.E., Woo, N., 2003. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. Life sciences 72, 805-818.

[10]. Dehghan, M., 2012. Screening of probiotic bacteria and yeast from gastrointestinal tract of Beloga (*Huso huso*) fingerling and study the potential of bioencapsulation with *Artemia urmiana*. M.Sc. thesis Gonbad Kavous University. 104 p.

[11]. Dehert, P., Lavensm, P., Sorgeloos, P., 1992. Probiotics an the immune system. In: Tannock, G.W. (Ed.), Journal of the Word Aaquaculture Society 23, 317-329.

[12]. Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Characterization of *Bacillus* Isolated from the gut of Rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. Apply Aquaculture 12, 33-42.

[13]. Ghosh, k., Sen, S.k., Ray, A.k., 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium , *Bacillus circulans*, in Formulated diets for Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings. Aquaculture 55, 13-25.

[14]. Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H., Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Nutrition 17, 498-504.

[15]. Jafaryan, H., Taati, M., Slamloo, Kh., 2009. The effects of *B. licheniformis* and *B. subtilis* for promoting resistance of Trichogaster tericoterus larvae in challenge with stress. Asian Pacific Aquaculture 2009 and Malaysian International Seafoods Exposition 2009 November 3-6. Kuala Lumpur, Malaysia. PP: 250.

[16]. Jalali, M.A., Ahmadifar, E., Sudagar, M., Takami, G.A., 2009. Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. Aquaculture Reserch 40, 804–809.

[17]. Kapetanovic, D., Kurtovic, B., Teskeredzic, E., 2005. Difference in bacterial population in raibow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum) fry after transfer from incubator to pools. Food Technolpgy and Biotechnology 48, 89-193.

[18]. Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzman-Mendez, B.E., Lopez-Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216, 193–201.

[19]. Li, P., Burr, G.S., Goff, J., Whiteman, K.W., Davis, K.B., Vega, R.R., Neill, W.H., Gatlin III, D.M., 2005. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewer's yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture Reserch 36, 1120–1127.

[20]. Noh, S.H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J., 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. Korean Animal Science 36, 480-486.

[21]. Makridis, P., Bergh, Q., Skjermoj, J., Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in Artemia metanauplii to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International 9, 225- 235.

[22]. Ortuno, J., Cuesta, A., Rodrıguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology 7, 315- 325

[23]. Postlethwaite, E., Mcdonald, D., 1995. Mechanisms of Na^+ and Cl^-regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. Journal of Experimental Biology 198, 295-304

[24]. Prodocimo, V., Galvez, F., Freire, C.A., Wood, C.M., 2007. Unidirectional Na^+ and Ca^{2+} fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus* mykiss, acutely submitted to

a progressive salinity increase. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 177, 519-528.

[25]. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitvorakul, S., Menasveta, p., 1998. Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313.

[26]. Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A., Carnevali, O., 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. Fish Physiology and Biochemistry 32, 167-177.

[27]. Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2001. Effect of dietary β-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). Fish and Shellfish Immunology 11, 683–695.

[28]. Tovar-ramirez, D., Infante, J.Z., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez-Juarez, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234, 415–427.

[29]. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbilogy and Molecular Biology Reviews. Applied Microbiolgy 64, 655-671.