

مقاله علمی - پژوهشی:

غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک بومی جداسازی شده از ماست محلی بهبهان و تاثیر آن در تغذیه ماهی مولی (*Poecilia sphenops*)

سعید ضیایی نژاد^{۱*}، یکتا خدری^۲، غزل نصیریان^۲، مینو رضوی^۲، صدرا سیدی^۱

*Zbsaeed@yahoo.com

۱- گروه شیلات، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان

۲- دبیرستان استعدادهای درخشان فرزنانگان دکتر عادل، آموزش و پرورش شهرستان بهبهان، خوزستان، ایران

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

این تحقیق با هدف غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک بومی جداسازی شده از ماست محلی بهبهان و تاثیر آن در تغذیه ماهی مولی انجام گرفت. ناپلیوس‌های *Artemia franciscana* به عنوان حامل در فرآیند غنی‌سازی برای انتقال پروبیوتیک لاکتوباسیلوس جداسازی شده از ماست محلی بهبهان به دستگاه گوارش لاروهای ماهی مولی به کار رفتند. ناپلیوس‌ها با دو غلظت ۱۰^۳ و ۱۰^۶ پروبیوتیک به ازاء هر میلی‌لیتر غنی شده و در تیمارهای آزمایشی به لاروهای ماهی مولی خوراندند. نتایج حاکی از تاثیر مثبت این شیوه غنی‌سازی بر روند رشد، بازماندگی و شاخص‌های تغذیه‌ای در ماهی مولی بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها بازماندگی نشان داد که هر دو تیمار پروبیوتیک بهبود معنی‌داری نسبت به گروه شاهد از خود بروز دادند ($P < 0/05$) (جدول ۳). هر دو تیمار A3 و A6 از نظر شاخص‌های رشد (وزن کل، نرخ وزن نسبی، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه) دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد بودند ($P < 0/05$)، اما در مورد طول کل و شاخص وضعیت هیچ تفاوت معنی‌داری بین کلیه تیمارها مشاهده نگردید ($P > 0/05$). هر دو تیمار A3 و A6 از نظر شاخص‌های تغذیه‌ای (کارایی تبدیل غذایی، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین، نسبت کارایی چربی)، دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد بودند ($P < 0/05$). بنابراین، بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک لاکتوباسیل جداسازی شده از ماست محلی بهبهان پتانسیل خوبی در جهت بهبود شرایط رشد به‌ویژه بازماندگی ماهی زینتی مولی دارد و می‌تواند مشکل تلفات دوره لاروی این ماهی را در مراکز تکثیر و پرورش مرتفع نماید.

کلمات کلیدی: آرتمیا، غنی‌سازی، ماهی مولی، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس، ماست بهبهان

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری به سرعت در حال گسترش است. این ترکیبات یا به عبارت دیگر، "مکمل غذایی میکروبی زنده هستند که از طریق بهبود بالانس میکروبی روده، تاثیرات سودمندی بر میزبان دارند"، کاملاً در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها یا مواد پاد زیست قرار می‌گیرند (Fuller, 1989).

چندین روش برای استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری وجود دارد و در واقع، موفقیت استفاده از آنها مستقیماً با انتخاب بهترین روش در ارتباط است. به نظر می‌رسد، در پرورش لارو آبی‌پران به‌ویژه اگر هدف از استفاده پروبیوتیک بهبود رشد و شرایط تغذیه باشد، بهترین مسیر برای رسانش باکتری‌های پروبیوتیک به لارو آبی‌پران از طریق غذای زنده است. این مسئله که بتوان روده لارو آبی‌پران را با استفاده از باکتری‌های مفید از زمانی که دهان آنها باز می‌شود، کلونی‌سازی نمود، دارای مزیت زیادی است. زیرا جوامع پیشگام باکتریایی که روده را در مراحل اولیه کلونی‌سازی می‌نمایند، در مقایسه با سایر باکتری‌ها که در مراحل بعد وارد می‌شوند، دارای یک مزیت رقابتی هستند (Hansen and Olafsen, 1999).

تا به امروز، غنی‌سازی تغذیه‌ای یک تکنیک جافتاده در آبی‌پروری است و به عنوان فرآیندی برای افزایش کیفیت غذایی غذاهای زنده تعریف شده است (Kandathil et al., 2019). یکی از کاربردهای ناپلی آرتمیا، غنی‌سازی آن با پروبیوتیک‌ها و تلقیح دستگاه گوارش ارگانسیم هدف (آبی‌پرورشی)، از این طریق است (Gomez-Gil et al., 1998). از این ویژگی آرتمیا حتی می‌توان جهت رویارویی آبی‌پران با سویه‌های بیماری‌زا از طریق خوراکی استفاده نمود (Vine et al., 2006).

در مطالعات مختلفی از فرآیند کپسول‌دار کردن زیستی به عنوان حامل جهت رسانش باکتری‌های پروبیوتیک به مراحل لاروی جانوران آبی یا تلقیح دستگاه گوارش استفاده شده است (Garcia-de-la-Banda et al., 1992; Rengpipat et al., 1998; Makridis et al., 2001; Planas et al., 2004; Venkat et al., 2004; Ziaei-Nejad et al., 2006; Agh et al., 2019). به علاوه، کاربرد موفقیت‌آمیز پروبیوتیک‌های باکتریایی از طریق آرتمیا در پرورش لارو آبی‌پران که با بهبود رشد

و بازماندگی همراه بوده، در چندین تحقیق گزارش شده است (Rengpipat et al., 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006).

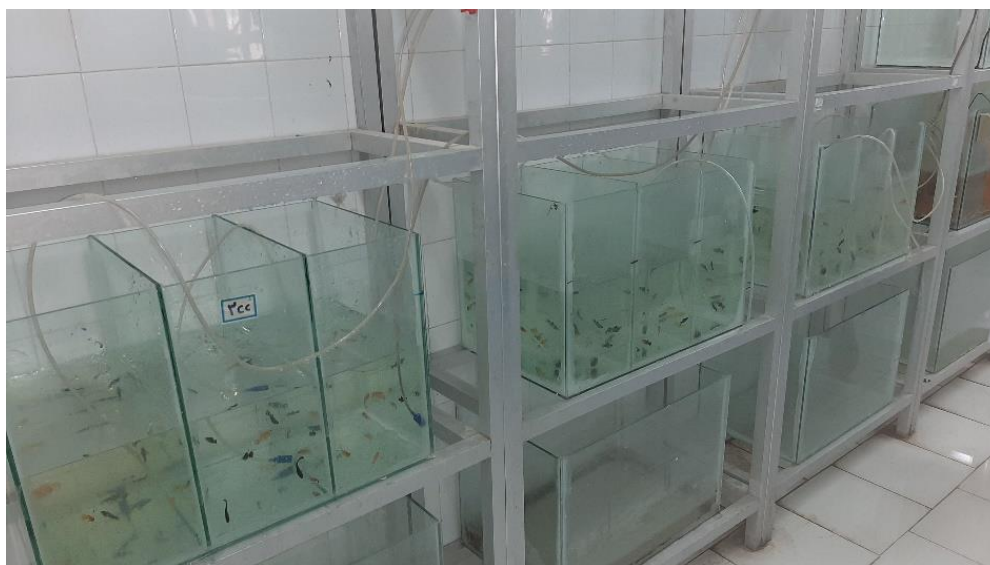
باید آزمایش‌هایی انجام داد تا مطمئن شد که آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک حامل خوبی جهت رسانش آن به موجودات آبی و تاثیرگذاری مثبت بر آنها خواهد بود یا خیر. ناپلی زنده آرتمیا پتانسیل خوبی برای این هدف دارد، زیرا می‌تواند باکتری‌ها را بخورد (Makridis and Vadstein, 1999) و به عنوان حامل به کار گرفته شود (Planas et al., 2004). این امر در لارو ماهی توربت (Garcia-de-la-Banda et al., 1992) لارو ماهی هالیبوت (Makridis et al., 2001) و در میگوی ببری سیاه (Rengpipat et al., 1998) میگوی بزرگ آب شیرین (Venkat et al., 2004) و میگوی سفید هندی (Ziaei-Nejad et al., 2006)، به اثبات رسیده است.

با توجه به این که ماهی مولی یکی از گونه‌های با ارزش زینتی است و افزایش شاخص‌های رشد و بازماندگی این ماهی در مراکز تکثیر و پرورش می‌تواند سودآوری بالایی داشته باشد و تا کنون هیچ تحقیقی در خصوص تغذیه این ماهی با پروبیوتیک غنی شده درون آرتمیا صورت نپذیرفته است، بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک بومی جداسازی شده از ماست محلی بهبهان و تاثیر آن در تغذیه ماهی مولی (*Poecilia sphenops*) طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تیمار بندی و ذخیره‌سازی

کلیه مراحل عملی تحقیق حاضر به مدت ۲۵ روز مهرماه ۱۴۰۲ در دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان دانشکده منابع طبیعی انجام گردید. پس از آماده‌سازی، شستشو و ضد عفونی کردن مخازن، ۱۳۵ قطعه ماهی مولی (*Poecilia sphenops*) با میانگین وزنی 0.1 ± 0.05 گرم به صورت کاملاً تصادفی در ۹ آکواریوم شیشه‌ای ۱۰ لیتری دارای هوادهی مناسب توزیع گردیدند (شکل ۱) (به ازاء هر آکواریوم ۱۵ قطعه ماهی). جهت تأمین آب از منبع آب شهری استفاده گردید.



شکل ۱: تیمار بندی ماهی مولی در آکواریوم‌های ۱۰ لیتری

پروبیوتیک مورد استفاده

پروبیوتیک مورد استفاده در این مطالعه شامل باکتری *Lactobacillus plantarum* بود. این باکتری پروبیوتیک قبلاً طبق روش Honarmand Jahromi و همکاران (۲۰۱۹) جدا سازی شده بود. برای این منظور ۳۲ نمونه ماست سنتی از شهرستان بهبهان جمع‌آوری شدند. یک گرم از نمونه ماست جمع‌آوری شده در ۹ میلی‌لیتر آب پیتونه ۰/۱ درصد هموژنیزه شده، در شرایط استریل به صورت پورپلیت رقیق شده و در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد (MRS (Quelab) و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیشه‌های بی‌هوازی حاوی کیسه گاز (مرک، آلمان) انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، پلیت‌ها بررسی شده و کلنی‌های با مورفولوژی متفاوت از محیط جدا و خالص‌سازی شدند. کلنی‌های خالص‌سازی شده بر اساس تست‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مطابق با کتابچه باکتری شناسی Bergey شناسایی شدند (Holt *et al.*, 2000).

ویژگی پروبیوتیک باکتری‌ها بر اساس فلوجارت پیشنهادی Ziaei-nejad (۲۰۱۶) تعیین شد. پس از شناسایی مولکولی با روش PCR و تعیین توالی تعدادی از نمونه‌ها، باکتری‌های جداسازی شده در سطح جنس و گونه شناسایی شدند. زنده ماندن این باکتری با کشت و شمارش آنها در محیط کشت MRS آگار تعیین شد (Zhang *et al.*, 2019). رقت‌های سریالی نمونه‌های پروبیوتیک تهیه شد. از هر رقت، ۱۰۰

میکرولیتر در محیط کشت MRS آگار (Quelab) پخش شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیشه‌های بی‌هوازی حاوی کیسه گاز (مرک، آلمان) انکوبه شد.

غنی‌سازی آرتمیا

غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک مذکور به روش Ziaei-nejad (۲۰۱۴) انجام گرفت. برای این منظور از سیستم *A. franciscana* (شرکت صیدانه پرور، ایران) استفاده گردید. سیستم‌ها بر اساس روش Sorgeloos و همکاران (۱۹۷۷) کپسول‌زدایی گردید. سیستم‌های کپسول‌زدایی شده در شوری ۳/۵ درصد، دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰ لوکس نور همانگونه که Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸) شرح دادند، تخم‌نشایی گردیدند. ناپلی آرتمیا با تراکم ۵۰ ناپلی در هر میلی‌لیتر در ظروف پلاستیکی ۱/۵ لیتری در معرض سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند. هر باکتری با دو غلظت متفاوت 10^3 و 10^6 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر به عنوان به آرتمیا داده شد. برای تیمار شاهد نیز به آرتمیا هیچ پروبیوتیکی اضافه نگردید. بعد از گذشت ۸ ساعت آرتمیاهای غنی‌سازی شده برداشت گردید و روزانه برای تغذیه ماهی‌های مولی در تیمارهای مختلف طبق جدول ذیل مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی به مدت ۲۵ روز، روزانه به میزان ۱۰ درصد وزن بدن با ناپلی آرتمیا، طبق جدول ۱، تغذیه شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت.

جدول ۱: تیمارهای غذایی آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق

تیمار	نوع غذا
C	تغذیه با آرتمیای غنی سازی نشده (تیمار شاهد)
A3	تغذیه با آرتمیای غنی سازی شده با 10^2 CFU/ml پروبیوتیک (ضیایی نژاد، ۱۳۹۳)
A6	تغذیه با آرتمیای غنی سازی شده با 10^6 CFU/ml پروبیوتیک (ضیایی نژاد، ۱۳۹۳)

فرمول (۵)

$$FCR = \frac{\text{میزان غذای داده شده (گرم)}}{\text{میانگین افزایش وزن خشک بدن (گرم)}}$$

کارایی تبدیل غذایی^۶:

فرمول (۶)

$$FCE = \frac{\text{میانگین افزایش وزن خشک بدن (گرم)}}{\text{میزان غذای داده شده (گرم)}}$$

نسبت کارایی پروتئین^۷:

فرمول (۷)

$$PER = \frac{\text{میزان افزایش وزن بدن (گرم)}}{\text{مقدار پروتئین جیره غذایی خورده شده (گرم)}}$$

نسبت کارایی چربی^۸:

فرمول (۸)

$$LER = \frac{\text{وزن به دست آمده (گرم)}}{\text{چربی خورده شده (گرم)}} \times 100$$

پس از اتمام دوره پرورش، ماهیان موجود در هر تیمار، شمارش صورت گرفت و درصد بازماندگی (Mazurkiewicz *et al.*, 2008) هر یک از تیمارها و تکرارها بر اساس فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفتند.

درصد بازماندگی^۹:

فرمول (۹)

$$SR = \frac{\text{تعداد ماهیان انتهای دوره}}{\text{تعداد ماهیان ابتدای دوره}} \times 100$$

در پایان دوره آزمایش جهت بیومتری، پس از بیهوش کردن ماهیان به وسیله پودر گل میخک با دوز ۳۰۰ میلی گرم در لیتر (Velisek *et al.*, 2005)، وزن با دقت ۰/۰۱ گرم (با استفاده از ترازوی AND_EK2001) و طول کل با دقت ۱ میلی متر (با استفاده از خط کش) اندازه گیری شد. ۲۴ ساعت قبل از بیومتری، غذادهی به ماهیان قطع گردید. با استفاده از داده های ثبت شده از زیست سنجی، شاخص های رشد، بازماندگی و تغذیه ای بر اساس فرمول های ذیل سنجیده شدند (Zokaeifar *et al.*, 2012; Mahmoodi *et al.*, 2023).

نرخ رشد ویژه^۱:

فرمول (۱)

$$SGR = \frac{\text{لگاریتم وزن اولیه بدن (گرم)} - \text{لگاریتم وزن نهایی بدن (گرم)}}{\text{طول دوره پرورش (روز)}} \times 100$$

شاخص وضعیت^۲:

فرمول (۲)

$$CF = \frac{\text{وزن نهایی ماهی (گرم)}}{\text{طول کل ماهی 3 سانتی متر}} \times 100$$

نرخ وزن نسبی به دست آمده^۳:

فرمول (۳)

$$RGR = \frac{\text{وزن اولیه بدن (گرم)} - \text{وزن نهایی (گرم)}}{\text{وزن اولیه بدن (گرم)}} \times 100$$

افزایش وزن روزانه^۴:

فرمول (۴)

$$DWG = \frac{\text{میانگین وزن اولیه (گرم)} - \text{میانگین وزن نهایی (گرم)}}{\text{طول دوره پرورش (روز)}} \times 100$$

ضریب تبدیل غذایی^۵:

1. Specific Growth Rate
2. Condition factor
3. Relative gain rate
5. Daily Waight Gain
5. Feed Conversion Ratio

6. Feed Conversion Efficiency
7. Protein Efficiency Ratio
8. Lipid Efficiency Ratio
9. Survival rate

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) اختلاف موجود در بین میانگین تیمارهای آزمایشی مشخص و سپس با استفاده از آزمون دانکن (Duncan rang Multiple test) معنی دار بودن تفاوت بین تیمارها به تفکیک در سطح اعتماد ۹۵ درصد ارزیابی گردید. برای انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. شایان ذکر است که قبل از انجام آزمون، نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی و در صورت نرمال نبودن، تبدیل داده‌ها انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌های رشد و بازماندگی در جدول ۲ ارائه داده شده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های رشد و بازماندگی بیانگر این بود که اثرات ساده هر کدام از تیمارها بر تمامی صفات رشدی مورد بررسی به استثناء طول کل و شاخص وضعیت معنی دار بود ($P < 0/05$) (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها بازماندگی نشان داد که هر دو تیمار پروبیوتیک بهبود معنی داری را نسبت به گروه شاهد از خود بروز دادند ($P < 0/05$) (جدول ۳). هر دو تیمار A3 و A6 از نظر شاخص‌های رشد (وزن کل، نرخ وزن نسبی، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه) دارای تفاوت معنی داری با گروه شاهد بودند ($P < 0/05$) اما در مورد طول کل و شاخص وضعیت هیچ تفاوت معنی داری بین کلیه تیمارها مشاهده نگردید ($P > 0/05$) (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با دوزهای مختلف پروبیوتیک

شاخص	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig.
بازماندگی	بین گروهها	۲	۷۷۵/۳۰۹	۱۷/۴۴۴	۰/۰۰۳
	درون گروهها	۶	۴۴/۴۴۴		
	کل	۸			
ضریب تغییرات (%)	۰/۱۷				
طول کل	بین گروهها	۲	۰/۳۰۱	۰/۹۷۱	۰/۴۳۱
	درون گروهها	۶	۰/۳۱۰		
	کل	۸			
ضریب تغییرات (%)	۰/۱۵				
وزن کل	بین گروهها	۲	۰/۰۴۴	۷/۶۴۴	۰/۰۳۲
	درون گروهها	۶	۰/۰۰۶		
	کل	۸			
ضریب تغییرات (%)	۰/۱۵				
نرخ وزن نسبی	بین گروهها	۲	۱۷۶۳/۱۱۱	۷/۶۴۴	۰/۰۲۲
	درون گروهها	۶	۲۳۰/۶۶۷		
	کل	۸			
ضریب تغییرات (%)	۰/۴۲				
افزایش وزن روزانه	بین گروهها	۲	۱/۹۹۹	۷/۶۴۴	۰/۰۲۲
	درون گروهها	۶	۰/۱۳۱		
	کل	۸			
ضریب تغییرات (%)	۰/۴۱				

Sig.	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	شاخص
۰/۰۱۴	۹/۴۷۷	۱/۷۲۹	۲	۳/۴۵۹	بین گروهها
		۰/۱۸۲	۶	۱/۰۹۵	درون گروهها
			۸	۴/۵۵۴	کل
				۰/۳۵	ضریب تغییرات (%)
۰/۹۳۱	۰/۰۷۳	۰/۰۸۰	۲	۰/۱۵۹	بین گروهها
		۱/۰۹۷	۶	۶/۵۸۵	درون گروهها
			۸	۶/۷۴۴	کل
				۰/۴۶	ضریب تغییرات (%)

جدول ۳: مقایسه شاخص های رشد و بازماندگی ماهیان جوان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک

تیمار	بازماندگی (درصد)	طول کل (سانتی متر)	وزن کل (گرم)	نرخ رشد ویژه	شاخص وضعیت	نرخ وزن نسبی	افزایش وزن روزانه (گرم)
تیمار شاهد (C)	۶۸/۸۸±۹/۲۸ ^a	۳/۲۳±۰/۲۵ ^a	۰/۶۵±۰/۰۴ ^a	۱/۲۶±۰/۲۹ ^a	۱/۹۶±۰/۳۷ ^a	۳۰/۶۶±۸/۳۳ ^a	۰/۷۳±۰/۱۹ ^a
A3	۹۵/۵۵±۳/۸۵ ^b	۳/۵۶±۰/۶۰ ^a	۰/۸۴±۰/۰۸ ^b	۲/۴۹±۰/۴۵ ^b	۲/۱۴±۱/۲۳ ^a	۶۹/۳۲±۱۶/۶۵ ^b	۱/۶۵±۰/۳۹ ^b
A6	۹۷/۷۷±۳/۸۴ ^b	۳/۸۶±۰/۷۰ ^a	۰/۸۷±۰/۰۹ ^b	۲/۶۵±۰/۴۹ ^b	۱/۸۲±۱/۲۷ ^a	۷۵/۱۶±۱۸/۵۸ ^b	۱/۷۹±۰/۴۴ ^b

میانگین±SD، اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند (P<۰/۰۵).

هر دو تیمار A3 و A6 از نظر شاخص های تغذیه ای (کارایی تبدیل غذایی، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین، نسبت کارایی چربی)، دارای تفاوت معنی داری با گروه شاهد بودند (P<۰/۰۵) (جدول ۵).

نتایج تجزیه واریانس داده های مربوط به شاخص های تغذیه ای نشان داد که اثرات ساده هر کدام از تیمارها بر تمامی صفات تغذیه ای مورد بررسی معنی دار بود (P<۰/۰۵) (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج تجزیه واریانس شاخص های تغذیه ای ماهی کپور معمولی تغذیه شده با دوزهای مختلف پروبیوتیک

Sig.	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	شاخص
۰/۰۲۲	۷/۶۴۴	۰/۰۰۱	۲	۰/۰۰۳	بین گروهها
		۰/۰۰۰	۶	۰/۰۰۱	درون گروهها
			۸	۰/۰۰۴	کل
				۰/۴۲	ضریب تغییرات (%)
۰/۰۰۷	۱۲/۷۳۹	۱/۹۱۸	۲	۳/۸۳۶	بین گروهها
		۰/۱۵۱	۶	۰/۹۰۳	درون گروهها
			۸	۴/۷۳۹	کل
				۰/۵۲	ضریب تغییرات (%)
۰/۰۲۲	۷/۶۴۴	۶/۸۰۲	۲	۱۳/۶۰۴	بین گروهها
		۰/۸۹۰	۶	۵/۳۳۹	درون گروهها
			۸	۱۸/۹۴۳	کل
				۰/۴۰	ضریب تغییرات (%)
۰/۰۲۲	۷/۶۴۴	۱۴۲/۹۲۷	۲	۲۸۷/۸۵۵	بین گروهها
		۱۸/۸۳۰	۶	۱۱۲/۹۸۰	درون گروهها
			۸	۴۰/۸۳۴	کل
				۰/۴۲	ضریب تغییرات (%)

جدول ۵: مقایسه شاخص‌های تغذیه‌ای ماهیان جوان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک

تیمار	ضریب تبدیل غذایی	کارایی تبدیل غذایی	نسبت کارایی پروتئین	نسبت کارایی چربی
تیمار شاهد (C)	۲/۳۸±۰/۵۹ ^a	۰/۰۳±۰/۰۱ ^a	۱/۹۰±۰/۵۱ ^a	۸/۷۶±۲/۳۷ ^a
A3	۱/۰۴±۰/۲۳ ^b	۰/۰۶±۰/۰۱ ^b	۴/۳۰±۱/۰۳ ^b	۱۹/۸۰±۴/۷۵ ^b
A6	۱/۰۰±۰/۲۲ ^b	۰/۰۷±۰/۰۱ ^b	۴/۶۷±۱/۱۵ ^b	۲۱/۵۲±۵/۳۰ ^b

میانگین±SD، اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

موفقیت استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری مستقیماً با انتخاب بهترین روش مصرف در ارتباط است. به نظر می‌رسد، در پرورش لارو آبزیان به‌ویژه اگر هدف از استفاده پروبیوتیک بهبود رشد و شرایط تغذیه باشد، بهترین مسیر برای رسانش باکتری‌های پروبیوتیک به لارو آبزیان از طریق غذای زنده مثل آرتمیاست.

تحقیق حاضر نشان داد که به‌خوبی می‌توان آرتمیا را با پروبیوتیک جداسازی شده از ماست محلی بهبهان غنی‌سازی نمود و ماهی مولی به‌خوبی از این آرتمیا تغذیه می‌نماید که نتیجه آن بهبود شرایط رشد، بازماندگی و تغذیه این ماهی در تحقیق حاضر بود. استفاده از این شیوه غنی‌سازی و تغذیه با پروبیوتیک به احتمال زیاد باعث افزایش مقاومت این ماهی به‌خصوص در برابر استرس ناشی از شرایط اسارت شده که بهبود میزان بازماندگی در ماهی مولی را سبب شد. به‌طور کلی، می‌توان گفت بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک دارای آنزیم‌های خارج سلولی از جمله آمیلاز، لیپاز و پروتئاز هستند که از طریق تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی سبب بهبود و ارتقاء سطح تغذیه به‌وسیله میزبان می‌شوند و با افزایش قابلیت هضم و جذب بهتر مواد غذایی مصرفی به‌وسیله ماهی، موجب افزایش کارایی تغذیه و رشد بیشتر در آبزیان می‌گردند (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). در خصوص ماهیان زینتی آنچه بیشتر از شاخص‌های رشد دارای اهمیت بوده، میزان بازماندگی این ماهی‌هاست که در تحقیق حاضر به‌خوبی افزایش یافت.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهیان تغذیه شده با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک لاکتوباسیل جداسازی شده از ماست محلی بهبهان بهبود یافته و اثرات مثبتی در پی داشته است به‌طوری‌که اکثر شاخص‌های رشد و بازماندگی به‌ویژه در هر دو تیمار A3 و A6 در مقایسه با شاهد بهبود یافتند و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

همسو با نتایج تحقیق حاضر، گزارش‌های متعددی نیز در زمینه استفاده موفقیت‌آمیز از آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک‌ها در زمینه پرورش لاروی آبزیان منتشر شده است (Garcia-de-la-Banda, *et al.*, 1992, Rengpipat *et al.*, 1998, Makridis *et al.*, 2001, Gatesoupe, 2002, Venkat *et al.*, 2004, Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Agh *et al.*, 2019). آنچه مهم است این نکته است که از این طریق می‌توان به‌خوبی دستگاه گوارش لارو آبزیان را با باکتری‌های مفید کلونی‌سازی نمود و تعادل میکروبی آن و در نتیجه رشد و بازماندگی را بهبود بخشید.

بیان شده است که تغذیه لاروهای میگوی ببری سیاه با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus S11* زمان تکامل لاروی را کوتاه‌تر می‌کند و بازماندگی را افزایش می‌دهد (Rengpipat *et al.*, 1998). به‌طور مشابهی، Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۶) بعد از تغذیه لاروهای میگوی سفید هندی *F.indicus* با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus spp.* بازماندگی بالاتر و فعالیت بیشتر آنزیم‌های گوارشی را مشاهده نمودند. به‌علاوه، Venkat و همکاران (۲۰۰۴) رشد و ضریب تبدیل غذایی بهتری را در لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین که با آرتمیای غنی‌سازی شده با باکتری پروبیوتیک *L. sporogenes* تغذیه شده بودند، گزارش دادند. در مورد لارو ماهیان نیز نشان داده شده که تغذیه دو پروبیوتیک تجاری باکتوسل (*Pediococcus acidiiactici*) و لیووسل (*Saccharomyces cerevisiae*) به لارو ماهی *P. pollachius* از طریق آرتمیا باعث بهبود رشد شده است (Gatesoupe, 2002). Jannah و همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان دادند که یاکتری‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند عملکرد رشد را در ماهی گوبی بهبود بخشد.

دلایل افزایش شاخص‌های رشد را شاید بتوان به تولید ترکیبات مفید و آنزیم‌های گوارشی به‌وسیله پروبیوتیک‌ها نسبت داد (Ziaei-nejad *et al.*, 2006). Wang و همکاران (۲۰۰۸)

بدین وسیله، از زحمات دلسوزانه سرکار خانم حکیمه بخرد تشکر می‌نمایم. همچنین از ریاست محترم دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان که زمینه اجرای پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

- Agh, N., Irani, A., Noori, F. and Tookmehchi, A., 2019.** Survey of *Lactobacillus delbrueckii* effects on Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) in different life stages. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(2), 40-52. DOI:10.22113/jmst.2019.156745.2227
- Anderson, D.P., 1992.** Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Reviews of Fish Disease* 2, 281-307. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90067-8).
- Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>.
- Garcia de la Bande, I., Chereguini, O. and Rasines, I., 1992.** Influence of lactic bacterial additives on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae culture. *Bol Inst Esp Oceanogr*, 8, 247-254.
- Gatesoupe, F.J., 2002.** Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*, *Aquaculture*, 212, 347-360. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00138-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00138-2).
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega M.A., Abreu-Grobois, F.A. and Roque A., 1998.** Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2318-2322. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.64.6.2318-2322.1998>.

نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک *Enterococcus faecium* به عنوان مکمل غذایی در جیره ماهی تیلپیا سبب افزایش شاخص‌های رشد می‌شود. این افزایش رشد در نتیجه استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به این دلیل باشد که باکتری‌ها می‌توانند فعالیت هضم را به واسطه تولید ویتامین و کوفاکتورها از طریق بهبود فعالیت‌های آنزیمی ارتقاء دهند.

شواهدی وجود دارد که باکتری‌های زیست‌یار با تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش مقاومت آنها در برابر استرس‌های محیطی می‌گردد و درصد بقاء را بالا می‌برند (Nikoskelainen *et al.*, 2003). اصولاً پلی آمین‌های مترشحه از پروبیوتیک‌ها موجب افزایش مقاومت میزبان در مقابله با استرس‌های محیطی و افزایش درصد بقاء می‌گردد.

این احتمال هم وجود دارد که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی، نسبت جذب مواد غذایی موجود در جیره را افزایش دهد. به طور کلی، ضریب تبدیل غذایی پایین نشان‌دهنده این است که مصرف غذا در ماهیان، به موازات استفاده از پروبیوتیک، کاهش می‌یابد (Anderson, 1992) که از لحاظ اقتصادی برای پرورش دهندگان حائز اهمیت است. پروبیوتیک‌ها به دلیل ترشح آنزیم‌های خارج سلولی نظیر برخی از آنزیم‌های گوارشی از جمله آمیلاز، پروتئاز و لیپاز، نقش بسیار مهمی در افزایش فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در روده ماهیان دارند. بنابراین، این باکتری‌ها موجب افزایش قابلیت هضم پذیری پروتئین، چربی و مواد قندی شده و در نتیجه کارایی تغذیه و رشد بهتری را در لاروهای آبزیان موجب می‌گردند.

بنابراین، بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک لاکتوباسیل جداسازی شده از ماست محلی بهبهان پتانسیل خوبی در جهت بهبود شرایط رشد به‌ویژه بازماندگی ماهی زینتی مولی دارد و می‌تواند مشکل تلفات دوره لاروی این ماهی را در مراکز تکثیر و پرورش را مرتفع نماید. این موضوع می‌تواند زمینه ساز پیشرفت‌های چشمگیری در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی باشد، هر چند تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه باید انجام شود تا تمام جنبه‌های زیستی این موضوع و مکانیسم‌های درگیر در آن به‌خوبی شناخته شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی آموزش و پرورش شهرستان بهبهان (دبیرستان استعدادهای درخشان فرزندان دکتر عادل)، در قالب طرح ملی کارسوق ژنتیک به انجام رسیده است.

- Hansen G.H. and Olafsen J.A., 1999.** Bacterial interaction in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.*, 38, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s002489900158>.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 2000.** Bergey's manual of determinative bacteriology 9th edition. Edited by Lippincott Williams and Wilkins. USA
- Honarmand Jahromi, S., Baghbani Arani, F. and yaghoobi, F., 2019.** Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic characteristics from traditional yogurts of Varamin city. *Iranian Biological Science Journal*, 14(1), 9-18. <https://doi:20.1001.1.17354226.1398.14.1.2.1>.
- Jannah, S., Adityani, R., Saraswati, T. and Purwantisari, S., 2023.** The effect of probiotic *Lactobacillus paracasei* on the performance of guppy fish (*Poecilia reticulata* var. *Mosaic*). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 15(1), 75-86. doi:<https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v15i1.39899>
- Kandathil, R.D., Akbar, A.I., Schmidt, B.V., John, E.M., Sivanpillai, S. and Thazhakot-Vasunambesan, S., 2019.** Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51: 1-17. DOI:10.1111/are.14357
- Mahmoodi, B., Aberoumand, A., Ziaei-Nejad, S. and Seyyedi, S., 2023.** Effects of diets containing grape pomace on the growth, nutrition indices, and the quality traits of common carp (*Cyprinus carpio*). *Food Science and Nutrition*, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.3614>.
- Makridis P. and Vadstein O., 1999.** Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages. *Journal of Plankton Research*, 21, 2191–2201. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.11.2191>.
- Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J. and Vadstein, O., 2001.** Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture Int.* 9, 225–235. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016815929846>.
- Mazurkiewicz, J., Przybyl, A. and Golski, J., 2008.** Evaluation selected feeds differing in dietary lipids levels in feeding juveniles of Wells catfish (*Silurus glanis*). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 38: 91-96. <https://doi.org/10.3750/AIP2008.38.2.02>.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish. Shellfish Immun.* 15, pp. 443-452. [https://doi.org/10.1016/s1050-4648\(03\)00023-8](https://doi.org/10.1016/s1050-4648(03)00023-8).
- Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Perez-Lomba, R., Gonzalez, M.P. and Murado, M., 2004.** Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240, 313-329. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.016>.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Sirirat, R., Wannipa, P., Somkiat, P. and Piamsak, M., 1998.** Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival

- and growth. *Aquaculture*, 167, 301-313. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00305-6).
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Laviña, E., Baeza-Mesa, M. and Persoone, G., 1977.** Decapsulation of Artemia cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, 12, 311. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90209-5).
- Velisek, J., Svobodoza, Z. and Piaakova, V., 2005.** Effects of clove oil anesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Brno*, 74, 139-146. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200574010139>.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P. and Jain, K.K., 2004.** Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res*, 35, 501-507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01045.x>.
- Vine N.G., Leukes W.D. and Kaiser H. 2006.** Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev.*, 30, 404-427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>.
- Wang, Y.B., Tian, Z., Yao, J. and Li, W., 2008.** Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277, pp.203-207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.007>.
- Zhang, H., Wang, H., Hu, K., Jiao, L., Zhao, M., Yang, X. and Xia, L., 2019.** Effect of dietary supplementation of *Lactobacillus casei* YYL3 and *L. plantarum* YYL5 on growth, immune response and intestinal microbiota in channel catfish. *Animals* (Basel), 9, 1005-1020. <https://doi.org/10.3390%2Fani9121005>.
- Ziaei-Nejad, S., Habibi-Rezaei, M., Azari-Takami G., Lovett, DL, Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252, 516-524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>.
- Ziaei-Nejad, S., 2014.** Enrichment of artemia, *Artemia franciscana* using *Bacillus* bacterial probiotics. *Aquaculture Development* (Biological sciences) 8 (4), 57-67. <https://doi:20.1001.1.23223545.1393.8.4.6.8>.
- Ziaei-Nejad, S., 2016.** Application of probiotics in modern aquaculture. *Iranian Fisheries Science Research Institute*, 172P.
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. I., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, M., Arshad, A. and Nejat, N., 2012.** Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>.

Enrichment of *Artemia* with native probiotic isolated from Behbahan local yogurt and its effect on Molly fish (*Poecilia sphenops*) feeding

Ziaei-nejad S.^{1*}; Khedri Y.²; Nasirian Gh.²; Razavi M.²; Seyedi S.¹

*zbsaeed@yahoo.com

1- Department of Fisheries, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology

2- Adeli Exceptional Talents High School, Behbahan, Khuzestan, Iran

Abstract

This research was carried out with the aim of enriching *Artemia* with native probiotic isolated from Behbahan local yogurt and its effect on molly fish feeding. *Artemia franciscana* nauplii (*Artemia franciscana*) were used as carriers in the enrichment process to transfer *Lactobacillus* probiotic isolated from Behbahan local yogurt to the digestive system of mullet fish larvae. Nauplius were enriched with two concentrations of 10^3 and 10^6 probiotics per milliliter and were fed to mullet fish larvae in experimental treatments. The results indicated the positive effect of this enrichment method on growth, survival and nutritional parameters in mullet fish. The results of comparison of average survival data showed that both probiotic treatments showed significant improvement compared to the control group ($P < 0.05$) (Table 3). Both A3 and A6 treatments were significantly different from the control group in terms of growth factors (total weight, relative weight rate, daily weight gain, specific growth rate) ($P < 0.05$) in terms of total length and condition factor, there was no difference. No significance was observed between all treatments ($P > 0.05$). Both A3 and A6 treatments were significantly different from the control group in terms of nutritional factors (food conversion efficiency, food conversion coefficient, protein efficiency ratio, fat efficiency ratio) ($P < 0.05$). Therefore, in general, based on the results of this research, *Artemia* enriched with *Lactobacillus* probiotic isolated from Behbahan local yogurt has a good potential to improve the growth conditions, especially the survival of ornamental fish, and can solve the problem of larval mortality in breeding centers.

Keywords: *Artemia*, enrichment, Molly fish, *Lactobacillus* probiotic, Behbahan yogurt.