



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره اول، شماره چهارم، زمستان ۹۲

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی قابلیت پروبیوتیک پروتکسین در بهبود مقاومت ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta Valenciennes, 1830*) در برابر استرس‌های دما و شوری

فرشته خادمی^۱، میر مسعود سجادی^۲، ایمان سوری نژاد^{۱*}، ام البنین طاهری کندر^۱

^۱ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

^۲ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان

تاریخ ارسال: ۹۲/۱۱/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۵

چکیده

به منظور بررسی اثر پروبیوتیک پروتکسین بر میزان مقاومت ماهی صبیتی *Sparidentex hasta* نسبت به استرس‌های دما و شوری، آزمایشی با ۲۴۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزن اولیه $2/99 \pm 0/87$ گرم به مدت ۱۰ هفته انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح صفر، ۱، ۵/۰ و ۲ گرم پروبیوتیک پروتکسین در هر کیلوگرم جیره و با سه تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بودند. غذادهی در کل دوره به صورت دستی و بر اساس سیری کامل، روزانه در سه نوبت انجام شد. در پایان دوره، در آزمایش استرس دمایی، ماهیان به مدت ۳۰ دقیقه در معرض دو دمای ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در آزمایش استرس شوری، ماهیان به مدت یک ساعت در معرض دو شوری ۱۲ و ۷۰ قسمت در هزار قرار گرفتند. در تیمارهای سطح ۱ و ۲ گرم پروتکسین، میزان بازماندگی در برابر استرس دمایی بالا، دمای پایین و شوری بالا در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$). میزان بازماندگی در برابر استرس شوری پایین بین تیمارهای مختلف، دارای اختلاف معنی‌داری نبود ($P \geq 0/05$). از بین سطوح مختلف پروبیوتیک به کار برده شده، بهترین دوز مؤثر بر میزان بازماندگی در برابر استرس دما و شوری در ماهی صبیتی، سطح ۲ گرم پروتکسین بر کیلوگرم جیره غذایی بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن پروبیوتیک پروتکسین در جیره غذایی می‌تواند بر میزان بازماندگی در برابر استرس‌های دما و شوری بالا در بچه ماهی صبیتی مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: پروتکسین، جیره غذایی، آزمایش استرس، بازماندگی، ماهی صبیتی

*نویسنده مسئول: sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

با رشد جمعیت و افزایش تقاضا برای مصرف محصولات دریایی، صنعت آبی‌پروری ماهیان دریایی گسترش یافته و مورد توجه کشورها و سازمان‌های جهانی مسئول در بهبود وضعیت تغذیه و کاهش فقر قرار گرفته است. ماهی صبیتی با نام علمی (*Sparidentex hasta* (Valenciennes, 1830) از خانواده شانک ماهیان (Sparidae) و بومی خلیج فارس، غرب اقیانوس هند و آب‌های ساحلی کشور هند است. زیستگاه این گونه آب‌های ساحلی کم عمق و همچنین آب‌های عمیق است و عمدتاً از مهره‌داران و سخت پوستان تغذیه می‌کند. ماهی صبیتی دارای ارزش اقتصادی و شیلاتی بوده و تکثیر و پرورش آن در کشورهای حاشیه خلیج فارس از اهمیت خاصی برخوردار است (Hussain et al., 1981).

ماهیان دریایی در مراحل لاروی حساسیت بالایی به استرس‌های محیطی و بیماری‌های عفونی باکتریایی و انگلی دارند و این موضوع یکی از دلایل عمده کاهش میزان تولید در بسیاری از مزارع پرورشی می‌باشد. از این‌رو برای موفقیت در تولید متراکم و انبوه، استفاده از روش‌هایی برای تقویت سیستم‌های دفاع طبیعی جاندار ضروری به نظر می‌رسد. از جمله مکمل‌هایی که در غذای لاروها و بچه ماهیان برای تقویت سیستم ایمنی استفاده می‌گردد، آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. استفاده از آنتی‌بیوتیک به دلیل مضراتی از قبیل سمیت حاصل از پس مانده‌های آنتی‌بیوتیکی و خطرات زیست محیطی آن و همچنین حساسیت‌زایی و ایجاد مقاومت در انسان اغلب توصیه نمی‌شود و در عوض به استفاده از پروبیوتیک‌ها یا زیست‌یارها به عنوان عوامل کنترل زیستی بیشتر سفارش و تأکید می‌گردد (Fuller, 1989).

در رابطه با تأثیر پروبیوتیک‌ها بر جنبه‌های مختلف آبی‌پروری می‌توان به عملکرد این باکتری‌های مفید در دفع رقابتی و جلوگیری از کلنی شدن باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارشی میزبان از طریق ترشح ترکیبات بازدارنده رشد یا رقابت برای غذا و مکان اشاره نمود. همچنین تحریک سیستم ایمنی میزبان در جهت تحمل بهتر محرک‌های محیطی و رشد را می‌توان از دیگر کارکردهای مفید پروبیوتیک‌ها برشمرد (Irianto and Austin, 2002). پروبیوتیک‌ها می‌توانند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم بر آزیان تأثیر بگذارند. در حالت اول با تغییر بر تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش آبی‌بزی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شوند (Ziaei-Nejad et al., 2006) و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب افزایش رشد می‌گردند (Tovar-Ramirez et al., 2002). در حالت دوم با بهبود کیفیت آب و محیط زیست آبی‌بزی باعث کاهش استرس می‌شوند که خود باعث کاهش احتمال بروز بیماری می‌شود، چرا که بین مقاومت میزبان، عوامل بیماری‌زا و محیط پرورش رابطه‌ای سه گانه برقرار است که هر یک دیگری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Verschuere et al., 2000). در این ارتباط گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی آزیان، باعث افزایش مقاومت لارو آزیان در برابر استرس‌های محیطی شده‌اند (Verschuere et al., 2000).

(Nikoskelainen *et al.*, 2003). از آنجا که دما و شوری از با اهمیت‌ترین عوامل خارجی می‌باشند که بر فعالیت‌های متابولیسمی ماهی اثر می‌گذارند، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر افزودن خوراکی پروبیوتیک پروتکسین که حاوی ۹ سویه از برترین باکتری‌های لاکتوباسیل، قارچ و مخمر است بر میزان بازماندگی در برابر استرس‌های محیطی دما و شوری در بچه ماهی صبیتی که یکی از گونه‌های مهم هدف در آبی‌پروری دریایی جنوب کشور می‌باشد، طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی شرایط آزمایش و تیمار بندی: پژوهش حاضر در مرکز بازسازی ذخایر آبزیان بندر کلاهی استان هرمزگان واقع در ۱۴۰ کیلومتری شهرستان بندرعباس به مدت ۱۰ هفته انجام شد. تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی صبیتی با وزن اولیه $20/87 \pm 2/99$ گرم به طور تصادفی به صورت گروه‌های ۲۰ قطعه‌ای به ۱۲ تانک فایبرگلاس با گنجایش ۳۰۰ لیتر منتقل شدند.

تهیه جیره‌های آزمایشی و غذایی: برای تهیه جیره‌های با سطوح صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره (جدول ۱)، از پروبیوتیک پروتکسین ساخت شرکت Probiotics International Ltd انگلستان با نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های ارائه شده توسط این شرکت طبق جدول ۲ و غذای کنسانتره تجاری مخصوص شانک ماهیان (شرکت بیومار فرانسه) استفاده شد (جدول ۳). لازم به ذکر است انتخاب سطوح پروبیوتیک در جیره بر اساس بررسی نتایج تحقیقات قبلی که از پروبیوتیک پروتکسین و سایر گونه‌های پروبیوتیک در تغذیه ماهی یا میگو استفاده کرده بودند انجام شد (Mohammadi Azarm *et al.*, 2004; Nickho *et al.*, 2009; Sajedi Rad *et al.*, 2010). بر حسب نوع جیره آزمایشی سطوح مختلف پروبیوتیک در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس بر روی پلت‌ها به صورت یکسان اسپری گردید (Chang and Liu, 2002; Faghani Langroudi, 2010). به‌منظور یکسان بودن شرایط، به غذای تیمار سطح صفر (شاهد) نیز آب مقطر افزوده شد. غذاهای تهیه شده تحت شرایط استریل در آزمایشگاه در معرض جریان هوا قرار داده شدند تا آب مخلوط شده با غذا تبخیر گردد. پلت‌های آماده شده تا زمان استفاده، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین مورد استفاده در جیره غذایی ماهیان مورد آزمایش

سطح مکمل	جیره غذایی فاقد پروتکسین	۰/۵ گرم	۱ گرم	۲ گرم
تیمارهای آزمایشی	گروه شاهد	PP _{۰.۵}	PP _۱	PP _۲

جدول ۲- تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های موجود در پروبیوتیک پروتکسین (بر اساس اطلاعات شرکت Probiotics International Ltd)

تعداد CFU/g	نوع میکروارگانیسم‌ها
$1/28 \times 10^8$	<i>Lactobacillus plantarum</i>
$2/22 \times 10^8$	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
$2/14 \times 10^8$	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
$2/28 \times 10^8$	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
$2/10 \times 10^8$	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
$4/18 \times 10^8$	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>
$5/60 \times 10^8$	<i>Enterococcus faecium</i>
$5/60 \times 10^7$	<i>Aspergillus oryzae</i>
$5/68 \times 10^7$	<i>Candida pintolopesi</i>
تعداد کل $2/09 \times 10^9$	

ماهی‌ها به مدت یک هفته با جیره شاهد تغذیه شده و پس از طی دوره سازگاری، غذادهی در طول دوره با جیره‌های آزمایشی به صورت دستی و بر اساس سیری کامل در سه نوبت صبح، ظهر و عصر (ساعات ۷/۰۰، ۱۳/۰۰ و ۱۹/۰۰) انجام شد. به منظور بهبود کیفیت آب مخازن، روزانه در دو نوبت صبح و عصر نسبت به تعویض آب تانک‌ها به میزان ۹۰ درصد اقدام شد. ماهیان به مدت ۱۰ هفته با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. شاخص‌های کیفی آب شامل دما، اکسیژن و pH با دستگاه دیجیتال (WTW) (ساخت آلمان) و شوری با دستگاه شوری سنج (مدل ATAGO ساخت ژاپن) به طور روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۴).

جدول ۳- آنالیز تقریبی غذای کنستانتره تجاری (بر اساس اطلاعات شرکت بیومار) (درصد)

میزان	ترکیب ترکیب شیمیایی
۵۴	پروتئین خام (%)
۱۸	چربی خام (%)
۱۲	عصاره عاری از ازت (%)
۱	سلولز خام (%)
۱۰	خاکستر (%)
۱/۶	فسفر کل (%)
۲۲/۱	انرژی ناخالص (MJ/kg)
۱۹/۴	انرژی قابل هضم (MJ/kg)
۲۵/۴	پروتئین قابل هضم / انرژی قابل هضم (g/MJ)
۷۵۰۰	ویتامین A (I.U/kg)
۱۵۰۰	ویتامین D3 (I.U/kg)
۲۶۰	ویتامین E (mg/kg)
۵۰۰	ویتامین C (mg/kg)

نحوه انجام تست‌های استرس: در پایان دوره آزمایش، تعداد ۱۵ قطعه بچه ماهی از هر تکرار و در مجموع تعداد ۴۵ ماهی از هر تیمار برای انجام آزمایش‌های استرس به صورت تصادفی از تانک‌های پرورش برداشته شدند. بچه ماهیان هر تکرار به صورت جداگانه در معرض هر یک از شوک‌های دما و شوری قرار داده شدند. لازم به ذکر است هر یک از این آزمایش‌ها برای هر شوک به صورت مجزا در سطل‌های پلاستیکی با گنجایش ۵۰ لیتر همراه با هوادهی ملایم برای بچه ماهیان هر تکرار انجام شد. شرایط محیطی در همه آزمایش‌ها یکسان بود. بچه ماهی‌ها به یکباره در محیط استرس‌زا قرار داده شدند. برای تعیین دما و شوری مورد استفاده در تست‌های استرس، ابتدا آزمایشاتی به عنوان پیش تست با بچه ماهیان موجود در کارگاه که دقیقاً هم سن و در شرایط یکسان با ماهیان مورد استفاده در آزمایش بودند انجام شد. دما و شوری‌های مختلف با توجه به دامنه تحمل این گونه ماهی نسبت به دما و شوری بالا و پایین و بر اساس منابع موجود آزمایش شدند و سرانجام دماهای پایین و بالای ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شوری‌های پایین و بالای ۱۲ و ۷۰ قسمت در هزار که در آنها بچه ماهیان علائم استرس و تلفات را نشان می‌دادند، انتخاب شدند.

تست استرس دما: این تست در دو دمای ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بدین صورت که ابتدا آب با دمای مورد نظر به وسیله کیسه‌های یخ بسته‌بندی شده (برای تهیه آب با دمای پایین) و هیترهای گرم کننده آب (برای تهیه آب با دمای بالا) فراهم شد. سپس به‌منظور بررسی میزان مقاومت در برابر استرس دمایی، بچه ماهی‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض این استرس‌ها قرار گرفتند و سپس به شرایط

عادی آزمایش برگردانده شدند. یک ساعت پس از انجام شوک، تعداد تلفات ماهیان در هر تیمار ثبت شد و درصد بازماندگی طبق رابطه زیر محاسبه گردید (Harpaz *et al.*, 1999).

$$100 \times (\text{تعداد ماهیان اولیه} / \text{تعداد ماهیان نهایی}) = \text{میزان بازماندگی}$$

تست استرس شوری: جهت انجام این تست از دو شوری ۱۲ و ۷۰ قسمت در هزار استفاده شد. بدین منظور ابتدا آب با شوری‌های مورد نظر با اضافه کردن آب شیرین (برای تهیه آب با شوری پایین) و افزودن نمک دریا (برای تهیه آب با شوری بالا) به آب تهیه شد. سپس بچه ماهی‌ها به مدت یک ساعت در معرض این شوری‌ها قرار گرفتند و سپس به شرایط عادی آزمایش برگردانده شدند. دو ساعت پس از پایان انجام شوک، تعداد تلفات بچه ماهیان در هر تیمار ثبت و در نهایت درصد بازماندگی محاسبه شد (Boutet *et al.*, 2006).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: در پایان آزمایش پس از جمع‌آوری اطلاعات، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) سنجیده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج نهایی، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS 17 انجام شد. ثبت داده‌ها و رسم نمودارهای مرتبط توسط نرم افزار Excel 2007 صورت گرفت.

نتایج

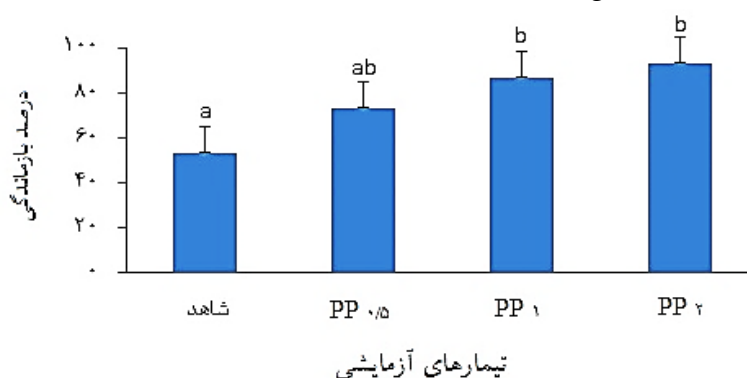
برخی شاخص‌های کیفی آب در جدول ۴ آمده است. نتایج حاصل از درصد بازماندگی بچه ماهیان صبیتی در برابر استرس‌های دمایی ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و استرس‌های شوری ۱۲ و ۷۰ قسمت در هزار در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین به ترتیب در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مخازن در دوره پرورش بچه ماهی صبیتی (میانگین \pm انحراف معیار)

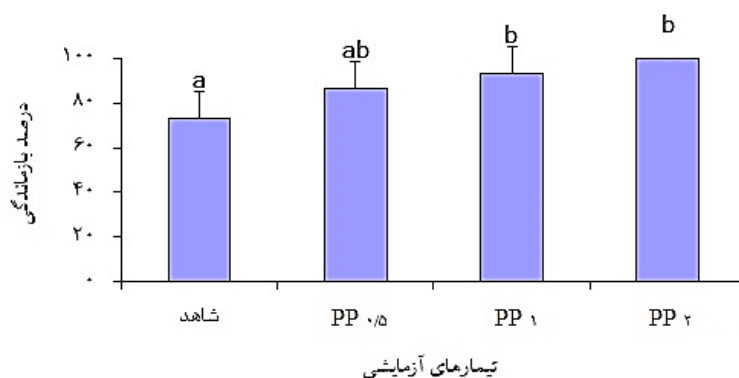
دما ($^{\circ}\text{C}$)	اکسیژن (mg/l)	شوری (ppt)	pH
۲۸/۹۰ \pm ۰/۷۶	۶/۸ \pm ۰/۲۳	۴۲	۷/۸۹ \pm ۰/۱۳

بر اساس این نتایج، درصد بازماندگی در برابر استرس دمایی ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و استرس شوری ۷۰ قسمت در هزار، بین ماهیان تغذیه شده با تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P < 0/05$). تمام ماهیانی که از جیره غذایی حاوی پروبیوتیک تغذیه شده بودند، درصد بازماندگی بالاتری نسبت به ماهیان تیمار شاهد در آزمایش‌های استرس دمایی ۱۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و استرس شوری ۷۰ قسمت در هزار داشتند. در بین تیمارهای تغذیه شده با پروتکسین، ماهیان تیمار PP_۲ که از

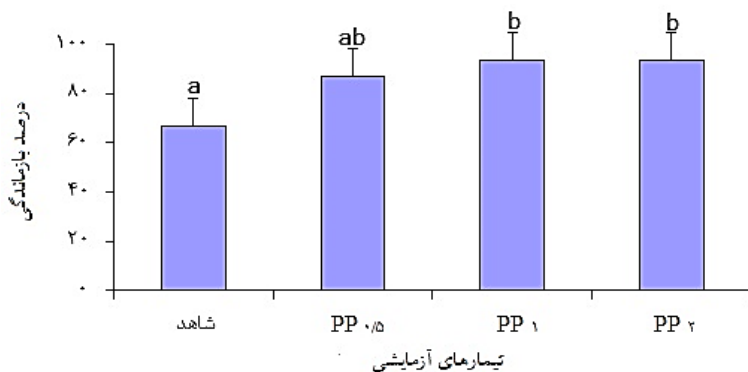
جیره حاوی سطح ۲ گرم پروتکسین در کیلوگرم جیره تغذیه شده بودند دارای درصد بازماندگی بالاتری نسبت به سایر تیمارها بودند. نتایج همچنین نشان داد که بین تیمارهای PP_۱ و PP_۲ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار آماری در میزان درصد بازماندگی در آزمایش‌های بیان شده وجود دارد ($P < 0/05$) (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). همچنین، با بررسی نتایج حاصل از درصد بازماندگی در برابر استرس شوری ۱۲ قسمت در هزار مشخص شد که بین ماهیان تغذیه شده با تیمارهای حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین اختلاف معنی‌دار آماری در میزان درصد بازماندگی وجود ندارد و همه تیمارها بازماندگی ۱۰۰ درصد نشان دادند ($P > 0/05$) (شکل ۴).



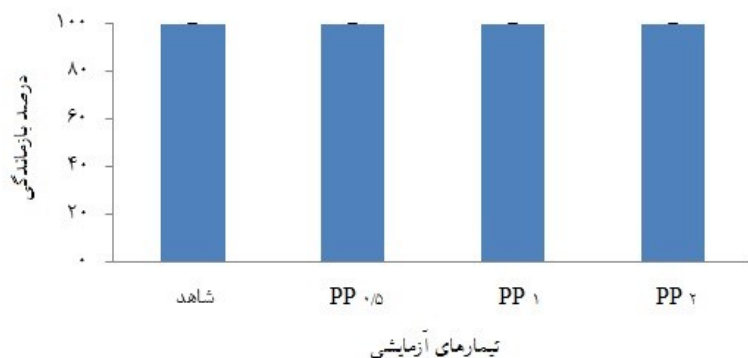
شکل ۱- درصد بازماندگی بچه ماهی صبیتی در برابر استرس دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین در پایان دوره ده هفته‌ای آزمایش (میانگین \pm انحراف از معیار؛ $n=3$). حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۲- درصد بازماندگی بچه ماهی صبیتی در برابر استرس دمایی ۱۵ درجه سانتی‌گراد در تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین در پایان دوره ده هفته‌ای آزمایش (میانگین \pm انحراف از معیار؛ $n=3$). حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۳- درصد بازماندگی بچه ماهی صبیتی در برابر استرس شوری ppt ۷۰ در تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین در پایان دوره ده هفته‌ای آزمایش (میانگین \pm انحراف از معیار؛ $n=3$). حروف متفاوت در بالای ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۴- درصد بازماندگی بچه ماهی صبیتی در برابر استرس شوری ppt ۱۲ در تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پروتکسین در پایان دوره ده هفته‌ای آزمایش (میانگین \pm انحراف از معیار؛ $n=3$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن پروبیوتیک پروتکسین به جیره غذایی باعث افزایش میزان بازماندگی بچه ماهی صبیتی در برابر استرس دمای بالا، دمای پایین و شوری بالا می‌شود. در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ۱ و ۲ گرم پروتکسین در کیلوگرم جیره، مقاومت در برابر دمای بالا، دمای پایین و شوری بالا افزایش یافته و دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد می‌باشد. همچنین از لحاظ میزان مقاومت به شوری پایین اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد.

در سایر تحقیقات، اثر پروبیوتیک باسیلی بر مقاومت لارو تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در برابر استرس‌های محیطی شوری، دما، آمونیاک و pH توسط (Faramarzi et al., 2012) بررسی شد. بعد از ۲۸ روز غذادهی، لاروهای تغذیه شده با دافنی *Daphnia magna* غنی سازی شده با پروبیوتیک باسیلی بازمندگی بالاتری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند.

در آزمایش مقابله با استرس سمیت آمونیاکی سه میلی گرم در لیتر، لاروهای ماهی سوروم *Heros* *severus* تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخمر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیا *Saccharomyces cerevisiae* نسبت به گروه شاهد از درصد بازمندگی بالاتری برخوردار بودند (Poordavod et al., 2010). در تحقیقی دیگر اثر تغذیه با مخمر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیا بر میزان مقاومت در برابر استرس شوری و بافت‌شناسی دستگاه گوارش بچه ماهیان نارس قزل آلائی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* بررسی شد (Pooramini et al., 2008). در آزمایش مقابله بچه ماهیان با شوری‌های ۱۰ و ۱۵ ppt پس از طی ۲۴ ساعت، تیمارهای حاوی مخمر از بازمندگی ۱۰۰ درصدی برخوردار بودند و با تیمار تغذیه شده با جیره فاقد مخمر تفاوت معنی‌داری داشتند.

مقاومت لارو تاس ماهی ایرانی تغذیه شده با دافنی ماگنای غنی شده با مخمر ساکارومایسیس سرویزیا *Saccharomyces cerevisiae* در برابر استرس شوری، دما، آمونیاک و pH نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Lashkarbolouki et al., 2001). بر اساس نتایج به دست آمده، درصد بازمندگی در جیره‌های آزمایشی به طور قابل توجهی بالاتر از جیره کنترل بود.

در آزمایشی دیگر، اثر غلظت‌های مختلف پروبیوتیک باسیلوس اضافه شده به جیره غذایی بر پارامترهای رشد، بازمندگی و مقاومت به استرس محیطی دمای بالا در لارو فرشته ماهی *Pterophyllum scalare* بررسی شد (Farahi et al., 2011). مقاومت به استرس دمای بالا در گروه آزمایشی تغذیه شده با غلظت 1×10^7 cfu/ml پروبیوتیک باسیلوس افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس می‌تواند بر پارامترهای رشد، بقا و استرس محیطی دمای بالا در لارو فرشته ماهی مؤثر باشد.

اثر سطوح مختلف 2×10^4 (T₁)، 2×10^5 (T₂)، 2×10^6 (T₃)، CFU.g⁻¹ پروبیوتیک پروتکسین از طریق مکمل سازی با دافنی ماگنا بر رشد و درصد بازمندگی قزل آلائی رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت (Ahmadvand et al., 2012). مکمل پروبیوتیک در پایان آزمایش در تیمار T₁ و T₂ اثری بر درصد بازمندگی نداشت اما درصد بازمندگی در تیمار T₂ به طور قابل توجهی نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود. درصد بازمندگی ماهی در استرس دمای بالا در تیمارهایی که با جیره حاوی پروبیوتیک به عنوان مکمل تغذیه شده بودند نسبت به گروه شاهد بهتر بود. درصد بازمندگی در شوری بالا در تیمارهای T₂، T₃ و تیمار شاهد یکسان بود در حالی که تیمار T₁ تفاوت قابل ملاحظه‌ای با دیگر گروه‌ها داشت. به‌طور کلی با

توجه به نتایج تحقیقات به نظر می‌رسد فرآورده‌های پروبیوتیکی سبب افزایش میزان مقاومت و بازماندگی ماهیان نسبت به انواع استرس‌های محیطی می‌گردند و بدین صورت به بهبود وضعیت سلامتی و رشد بهتر ماهیان کمک می‌کنند (Verschuere *et al.*, 2000; Nikoskelainen *et al.*, 2003).

با توجه به حساسیت بالای مراحل لاروی و نوجوانی ماهیان دریایی به استرس‌های محیطی و بیماری‌های عفونی باکتریایی و انگلی، بکارگیری تکنیک‌هایی که بتواند مقاومت بچه ماهیان را در برابر این استرس‌ها بالا ببرد از موارد قابل توجه محسوب می‌شود. همچنین بسیاری از جانوران آبی در مراحل رشد اولیه لاروی و نوجوانی از لحاظ فلور میکروبی روده‌ای در معرض تغییرات و نوسانات زیادی قرار دارند. زیرا به هنگام شروع تغذیه، حتی لوله گوارش آنها به‌طور کامل شکل نگرفته است و سیستم ایمنی نیز هنوز ناقص است (Vazquez-Juarez *et al.*, 1993). بر این اساس تیمارهای پروبیوتیک، به ویژه در دوران اولیه زندگی ماهی بسیار مطلوبند.

تحقیقات نشان داده است که استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان پروبیوتیک می‌تواند بر فاکتورهای بیان ژن در ارتباط با پاسخ به استرس و وضعیت سلامت جاندار مؤثر باشند (Avella *et al.*, 2010 b). فاکتورهای ایجاد کننده استرس می‌توانند باعث پاسخ‌های فیزیولوژیکی نظیر تغییر در سطح هورمون گلوکوکورتیکوئید و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) شوند. به‌طور ویژه در شرایط پر استرس، کورتیزول به‌عنوان اصلی‌ترین هورمون گلوکوکورتیکوئید، در پاسخ به استرس در ماهیان استخوانی شناخته شده است (Carnevali *et al.*, 2006) و به شدت به بیان ژن گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید وابسته می‌باشد (Vijayan *et al.*, 2003).

شرایط پر استرس، همچنین بیان ژن‌های HSPs (پروتئین‌های شوک حرارتی) به ویژه HSP70 (پروتئین شوک حرارتی ۷۰) را در سطح سلول فعال می‌کنند (Ackerman and Iwama, 2001). عموماً شرایط آبی‌پروری نیز استرس‌های فیزیولوژیکی را ایجاد می‌کند که منجر به سطوح بالاتر گلوکوکورتیکوئیدها در ماهی می‌شود (Fagundes and Criscuolo Urbinati, 2008). مطابق با این نظر، استرس می‌تواند سیستم عصبی را فعال کرده و واکنش هومورال در طول محور داخلی هیپوتالاموس-هیپوفیز ایجاد نماید که سرانجام منجر به رهاسازی سریع هورمون‌های استرسی کورتیکواستروئید نظیر گلوکوکورتیکوئیدها می‌شود. اثرات فیزیولوژیکی گلوکوکورتیکوئیدها با تنظیم گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید سلولی اعمال می‌شود. در قزل‌آلای رنگین‌کمان ثابت شده است که هورمون کورتیزول به‌طور قابل توجهی سطح mRNA را در گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها افزایش می‌دهد (Mommsen *et al.*, 1999). در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان همچنین یک ارتباط مثبت بین کورتیزول و سطح بیان ژن گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید گزارش شده است (Vijayan *et al.*, 2003). تحقیقات پیشین بیان نموده که استفاده از لاکتو باسیلوس دلبروکی *Lactobacillus delbrueckii* توانسته وضعیت سلامت ماهی سی

باس اروپایی *Dicentrarchus labrax* را افزایش دهد. همچنین، سطوح پایین تر کورتیزول در بچه ماهیان انگشت قد دریافت کننده پروبیوتیک پس از مواجهه با استرس گزارش شده است (Carnevali *et al.*, 2006). در بررسی تاثیر مخلوطی از باسیلوس‌ها بر وضعیت سلامتی ماهب شانک سر طلایی *Sparus aurata*، نتایج به دست آمده کاهش سطح بیان ژن HSP70 و کاهش سطح گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید را در تیمارهای آزمایشی نشان داد (Avella *et al.*, 2010 a). با توجه به این که نتایج تحقیق حاضر افزایش بازماندگی بچه ماهیان صبیتی را در برابر استرس‌های محیطی دما و شوری در تیمارهای پروبیوتیکی نشان داد تصور می‌شود که استفاده از مخلوطی از لاکتوباسیلوس‌ها، مخمر و قارچ در جیره ماهی صبیتی به طور مثبت بر وضعیت سلامت ماهی از طریق کاهش سطح گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید و کاهش بیان ژن HSP70 عمل می‌کند و میزان مقاومت به استرس‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین پلی‌آمین‌های مترشحه از پروبیوتیک‌ها و مخمرها موجب افزایش مقاومت میزبان در مقابله با استرس‌های محیطی می‌گردد (Tovar-Ramirez *et al.*, 2002). از بین رفتن سایر باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های مضر توسط باکتری‌های باسیلوس و یا رقابت این باکتری‌ها با سایر باکتری‌ها و در نهایت تشکیل فلور غالب باکتریایی یکی دیگر از دلایلی است که برای افزایش بازماندگی در تیمارهای پروبیوتیکی گزارش شده است (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). باکتری‌های باسیلوس هم قادرند سایر باکتری‌ها را با تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها از بین ببرند و هم قادرند برای مواد غذایی، فضا و سطح با سایر باکتری‌ها رقابت کنند. علاوه بر این، افزایش بازماندگی ممکن است به علت افزایش سطح ایمنی و مقاومت در برابر عوامل استرس‌زا در نتیجه فعال سازی دفاع ایمنی هومورال (Humoral Immune Defenses) و سلولی (Cellular Immune Defenses) و نیز با مکانیسم حذف رقابتی (Competitive Exclusion) در دستگاه گوارش در تیمارهای دریافت کننده پروتکسین باشد که پاسخ‌های ایمنی ماهی را در مقابل محرک‌های محیطی جهت تحمل بهتر آنها افزایش می‌دهد (Rengpipat *et al.*, 2000). همچنین بیان شده است که پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی باکتری‌های باسیلوس ممکن است با اثر بر گرانولوسیت‌ها برای فعالیت بیگانه‌خواری بیشتر، سبب عملکرد دفاعی در آبزیان و افزایش بازماندگی شود (Itami *et al.*, 1998).

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن دو گرم پروبیوتیک پروتکسین در هر کیلوگرم جیره غذایی با تقویت میکروفلور مفید روده به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک باعث افزایش مقاومت ماهی صبیتی در برابر استرس‌های دما و شوری بالا می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد پروبیوتیک پروتکسین در جیره غذایی با توجه به حساسیت و بازماندگی کم این ماهیان دریایی در دوران اولیه پرورش مفید باشد. علاوه بر این با بالا رفتن مقاومت بچه ماهی در برابر استرس دما و شوری که با متابولیسم انرژی بدن در ارتباط می‌باشد می‌توان به رشد بهتر و سریع‌تری دست یافت و به تبع آن در مدت زمانی کمتر، تراکم بیشتری از ماهی را پرورش داد.

سپاسگزاری

از ریاست وقت محترم شیلات استان هرمزگان جناب آقای دکتر میرزاده و ریاست و کارکنان محترم کارگاه بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی استان هرمزگان که در مراحل مختلف آزمایش یاری‌گر نویسندگان بودند و همچنین از خانم‌ها دکتر فرید و مهندس محمدی از شرکت نیکوتک بابت همکاری صمیمانه‌شان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

- Ackerman P.A., Iwama G.K. 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 173-180.
- Ahmadvand S., Jafaryan H., Farahi A., 2012. Effect of frozen *Daphnia magna* diet mixed with probiotic Protexin on growth and survival of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry reared under controlled conditions. *Journal of Animal and Feed Research*, 2(1): 34-39.
- Avella M.A., Gioacchini G., Decamp O., Makridis P., Bracciatelli C., Carnevali O. 2010a. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305: 12-19.
- Avella M.A., Olivotto I., Silvi S., Place A.R., Carnevali O. 2010 b. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298: 359-371.
- Boutet I., Long Ky C.L., Bonhomme F. 2006. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene*, 379: 40-50.
- Carnevali O., De Vivo L., Sulpizio R., Gioacchini G., Olivotto I., Silvi S., Cresci A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258: 430-438.
- Chang C.I.W., Liu W.Y. 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*, 25: 311-315.
- Faghani Langroudi H. 2010. Comparison of commercial probiotics of protexin and primalac on growth and survival in *Cyprinus carpio*. *Journal of Marine Biology*, 2(6): 65-74.
- Fagundes M., Criscuolo Urbinati E. 2008. Stress in Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, 276(1-4): 112-119.
- Farahi A., Kasiri M., Sudagar M., Alamshahi F. 2011. The effects on growth, survival and tolerance against environmental stressor (high temperature) of different concentrations probiotic *bacillus sp.*, fed to angelfish (*Pterophyllum*

- scalare schultz*, 1823) larvae. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(17): 2305-2311.
- Faramarzi M., Jafaryan H., Roozbehfar R., Jafari M., Rashidi Y., Biria M. 2012. Influences of probiotic Bacilli via Bioencapsulated *Daphnia magna* on resistance of *Persian Sturgeon* larvae against challenge tests. Global Veterinaria, 8(4): 421-425.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology, 66: 365-378.
- Harpaz S., Becker K., Blum R. 1999. The effect of dietary l-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of ornamental cichlid fish (*Pelvicachromis pulcher*) preliminary results. Journal of Thermal Biology, 24: 57-62.
- Hussain N.A., Akatsu S., El-Zahr C. 1981. Spawning, egg and early larval development and growth of *Acanthopagrus cuvieri*. Aquaculture, 22: 125-136.
- Irianto A., Austin B. 2002. Probiotic in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25: 1-10.
- Itami T., Asano M., Tokushige K., Kubono K., Nakagawa A., Takeno N., Nishimura H., Maeda M., Kondo M., Takahashi Y. 1998. Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164: 277-288.
- Lashkarbolouki M., Jafaryan H., Faramarzi M., Aminzadeh A., Borami A. 2001. Evaluation of resistance in *Acipenser percicus* larvae fed with bioencapsulated *Daphnia magna* via *saccharomyces cerevisiae* product (Amax) against challenge test. World Journal of Fish and Marine Sciences, 3(4): 340-345.
- Mohammadi Azarm H., Abedian Kenari A.A.M., Abtahi B. 2004. Effects of probiotic Protexin on the growth and survival of rainbow trout larvae (*Oncorhynchus Mykiss*). Journal of Marine Sciences and Technology, 3(2-3):69-75.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9: 211-268.
- Nickho M., Yosefian M., Safari R. 2009. Effects of probiotic Aqualase on growth and survival fingerling of wild common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Marine Science and Technology Research, 4(2): 27-34.
- Nikoskelainen S., Ouweland A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15: 443-452.
- Pooramini M., Kamali A., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Alizadeh M. 2008. Effect of feeding by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a probiotic, in contrast with salinity stress and on intestinal histology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Journal of Fisheries, 2(1): 1-11.

- Poordavod M., Sajadi M.M., Bahri A.H. 2010. The survey of effects of diets containing *Saccharomyces cerevisiae* (probiotic) on growth, survival and stress resistance in *Heros severus* (severum). Journal of Aquatic animals and Fisheries, 1(1): 23-31.
- Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). Aquaculture, 191: 271-288.
- Sajedi Rad A., Zamini A., Valipour A., Hayatbakhsh M.R. 2010. Effect of diet supplementation with protexin probiotic on growth indices and survival of *Astacus leptodactylus*. Journal of Microbial Biotechnology. 2 (4): 29-36.
- Tovar-Ramirez D., Zambonino J., Cahu C., Gatesoupe F.J., Vazquez-Juarez R., Lésel R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture, 204: 113-123.
- Vazquez-Juarez R., Andlid T., Gustafsson L., Wadstrom T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Canadian Journal of Microbiology, 39: 1135-1141.
- Verschuere L., Dhont J., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655-671.
- Vijayan M.M., Raptis S., Sathiyaa R. 2003. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. General and Comparative Endocrinology, 132: 256-263.
- Ziaei-Nejad S., Habibi Rezaei M., Azari Takami G., Lovett D.L., Mirvaghefi A.R., 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(2-4): 516-524.