تغـذیه و بیـوشیمی آبزیـان
سال سوم، شماره اول،
بهار و تابستان ۱۳۹۵

تغییرات فاکتورهای رشد در لارو فیل ماهی (*Huso huso*) مورد تغذیه با آرتمیای غنی شده با پروبیوتیک پروتکسین

سمیرا جعفریان*[۱]، مینا رنگرز[۲]، حجت‌الله جعفریان[۱]، نورمحمد مختومی[۳]، عبدالرحمان داودی پور[۳]
۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، گلستان
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، گلستان
۳- کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آق‌قلا، گنبد کاووس، گلستان

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۱۴

چکیده
ناپلیوس‌های آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) به عنوان حامل در فرآیند غنی‌سازی بـرای انتقـال مخلـوط پـنج گونـه از باسیلوس‌های پروبیوتیکی با عنوان محصول تجـاری پروتکسـین آکواتـک، شـامل *Bacillus circulans*، *B. subtilis*، *B. licheniformis*، *B. laterosporus* و *B. Polymyxa* به دستگاه گوارش لاروهای فیل ماهی به کار رفتند. ناپلیوس‌ها بـه مدت ۱۰ ساعت با سه غلظت ۱×۱۰^{۵}، ۲×۱۰^{۵} و ۳×۱۰^{۵} باکتری به ازای هر میلی‌لیتر در سوسپانسیون باکتریایی غنی شده و در تیمارهای آزمایشی به لاروهای فیل ماهی خورانده شدند. لاروها به میـزان ۵۰٪ وزن بـدن و روزانـه در ۶ نوبـت در قالـب طـرح کاملاً تصادفی تغذیه، و نتایج در پایان چهاردهمین روز آزمایش با گروه شاهد (ناپلیوس های آرتمیای بدون غنی‌سازی) مقایسـه شدند. نتایج حاکی از تأثیر مثبت پروبیوتیک باسیلی نسبت به تیمار شاهد بر روند رشد در لارو فیل ماهی بود. بـالاترین وزن در تیمار آزمایشی تغذیه شده از ناپلیوس های غنی شده با غلظت ۱×۱۰^{۵} باکتری به ازای هر میلی‌لیتر در سوسپانسیون باکتریـایی به‌دست آمد. ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای آزمایشی در حد معنی‌دار کاهش یافت. باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر نـرخ رشـد ویژه، نرخ وزن نسبی به دست آمده، درصد بقا، میانگین رشد روزانه و ضریب رشد حرارتی در مقایسه با شاهد، تأثیرات مثبـت و معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). همچنین غذای نسبی خورده شده نیز در حـد معنـی‌دار کـاهش یافـت ($P<۰/۰۵$)، درحالی‌کـه فاکتور وضعیت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). نتایج مطالعه نشان داد باسیلوس‌های پروبیوتیکی از قابلیت بـالایی در افزایش رشد لارو فیل ماهی برخوردارند و تیمار فیل ماهی تغذیه شده از ناپلیوس های غنی شده با غلظـت ۱×۱۰^{۵} بـاکتری نتایج بهتری داشت.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک پروتکسین، فیل ماهی، غنی‌سازی، ناپلیوس آرتمیا، نرخ رشد ویژه، ضریب رشد حرارتی

* نویسنده مسئول: Samira.jafaryan@gmail.com

مقدمه

بهینه‌سازی فاکتورهای تغذیه‌ای و میکروبی می‌تواند باعث رشد بهتر لاروهای ماهیان دریایی شده و تلفات سنگینی را که اغلب برای آنها اتفاق می‌افتد، کاهش دهد (Olsen, 1997)، به طوری که به‌کارگیری باکتری‌های پروبیوتیکی به عنوان یک راهبرد مهم برای تولید بهتر محصولات زنده قابل تجدید، از طریق کنترل بیولوژیک در کارگاه‌های پرورشی برای لارو ماهیان دریایی و سخت‌پوستان پیشنهاد می‌شود (Nogami and Maeda, 1992). جمعیت میکروبی دستگاه گوارش لاروهای آبزیان از باکتری‌هایی سرچشمه می‌گیرند که از طریق جمعیت میکروبی موجود در سطح پوششی تخم و همچنین، بخشی از این باکتری‌ها از طریق آب حوضچه و یا کارگاه‌های پرورشی به دستگاه گوارش لاروهای آبزیان وارد می شوند و یا به همراه غذاهای زنده مورد مصرف لاروهای این آبزیان، در دستگاه گوارش آنها استقرار می یابند (Skjermo and Vadstein, 1999).

ناپلیوس آرتمیا قادر به تغذیه از باکتری‌ها بوده و تعداد باکتری‌های تجمع پیدا کرده در خلال فرآیند غنی‌سازی، بستگی به غلظت سوسپانسیون باکتری و گونه‌های باکتری به‌کارگرفته شده دارد (Gomez-Gil et al. 1998). ناپلیوس غنی شده به عنوان غذای زنده در تغذیه لاروهای آبزیان دریایی به صورت یک حامل عمل می‌کند و باعث انتقال پروبیوتیک‌ها به دستگاه گوارش آبزی مورد پرورش می‌شود و سپس جمعیت باکتری آنها را تغییر می‌دهد (Makridis et al. 2001).

اولین آزمایش در خصوص پروبیوتیک‌ها عبارت بود از محصولات تجاری طراحی شده برای حیوانات خشکی که برای افزایش رشد آنها به‌کار گرفته شد. بعدها این محصولات تجاری پروبیوتیکی در تغذیه آبزیان پرورشی برای ارتقای عملکرد پرورشی آنها استفاده شد (Gatesoupe, 1999). نتایج آزمایش‌های صورت گرفته با پروبیوتیک‌های تجاری بر روی حیوانات خشکی موجب شد که پرورش‌دهندگان آبزیان در به‌کارگیری از افزودنی‌های باکتریایی به غذاهای آبزیان برای افزایش تولید آنها تمایل بیشتری پیدا کنند. در این آزمایش‌ها میزان بقا و ماندگاری باکتری‌های تجاری اضافه شده به غذای آبزیان پرورشی در لوله گوارشی این جانوران نامعلوم بود. بنابراین، بیشترین کوشش‌ها برای دستیابی به سویه‌های بومی ریزموجودات دارای خاصیت پروبیوتیکی معطوف شد که قادر به کلونی سازی در سطح اپی‌یای معده، روده کوچک و یا روده بزرگ حیوان میزبان باشند (Savage, 1989) و بتوانند مدت زمان زیادی را در دستگاه گوارش آبزیان زندگی کرده و اثرگذاری بیشتری داشته باشند. تأثیرات سودمند ریزموجودات پروبیوتیکی در دامپزشکی و گونه‌هایی مانند حیوانات اهلی مختلف به خوبی شناخته شده است (Fuller, 1989).

ناپلیوس آرتمیا در مدیریت غذایی آبزیان، عموماً به عنوان یک حامل زنده برای انتقال ترکیبات مختلف شیمیایی مورد آزمایش برای لارو ماهیان (Chair et al. 1991) مطرح است و غنی‌سازی آرتمیا با باکتری‌ها در واقع، فرآیندی است که در طی آن شرایطی مهیا می‌شود تا این این موجود نه تنها به عنوان یک غذای زنده بلکه به عنوان یک حامل برای تلقیح واکسن‌های خوراکی و باکتری‌ها به دستگاه گوارش ماهیان در مراحل لاروی آنها استفاده شود (Makridis et al. 2001). کاربرد مناسب پروبیوتیک‌ها نشان داد که باعث بهبود در تعادل جمعیت میکروبی، و و به تبع آن، هضم و جذب بهتر غذا در دستگاه گوارش آبزی هدف می‌شود (Fuller, 1989).

تحقیقات انجام شده نشان داده است که این ریزموجودات باعث افزایش عملکرد هضمی آنزیم‌ها (Tovar-Ramirez et al. 2004)، کاهش مشکلات ناشی از بیماری‌زایی باکتری‌های آسیب رسان در لوله گوارشی (Lloyd et al. 1997)، افزایش معیارهای رشد و تغذیه در لاروهای ماهیان (Ghosh et al. 2003)، ارتقای درصد بقای لاروهای ماهی (Bairagi et al. 2004) و افزایش رشد و بقای لاروهای میگو (Rengpipat et al. 1998) می‌شود. به هر حال، تأثیرگذاری پروبیوتیک‌ها در لاروهای آبزیان به اثبات رسیده است. در همین راستا، با توجه به اهمیت ماهیان خاویاری و از جمله فیل ماهی (*Huso huso*)، این تحقیق با هدف مطالعه توان بالقوه پروبیوتیکی باسیلوس‌های ذکر شده بر شاخص‌های رشد و بقای فیل ماهی در دوره پرورش لارو از طریق غنی‌سازی ناپلیوس‌های آرتمیا اورمیانا (*Artemia urmiana*) با

غلظت‌های مختلف از سوسپانسیون مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

سیست های آرتمیای مورد نظر در این بررسی از مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی ارومیه تهیه شد. لایه کوریون سیست ها مطابق با روش Sorgeloos و همکاران (۱۹۷۷) و به طریقه شیمیایی طی فرآیند کپسول‌زدایی، جدا شد. سیست های کپسول‌زدایی شده آرتمیا که جمعیت باکتریایی لایه پوششی آنها به همراه زدایش لایه کوریون آنها حذف شده بودند، در داخل توری با اندازه چشمه ۷۰ میکرون، توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور تخم‌گشایی سیست‌ها و تولید ناپلیوس‌های زنده، مطابق با روش Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸)، ابتدا سیست‌های کپسول‌زدایی شده با تراکم ۵ گرم در لیتر در دمای $30^{o}C$، شرایط نوری (۲۰۰۰ لوکس) و هوادهی شدید، در ظروف شیشه‌ای قیفی شکل استریل ، با حجم ۱۰ لیتر و با استفاده از آب دریای حاوی شوری ۳۰ گرم در لیتر (۳۰ ppt) که قبلاً در اتوکلاو استریل شده بود، انکوباسیون شدند. بعد از ۲۴ ساعت، ناپلیوس‌های تازه تخم‌گشایی شده، با استفاده از رفتار نورگرایی مثبت، از سیست‌های تخم گشایی نشده، جدا، و با به‌کارگیری صافی با چشمه ۱۲۰میکرون، سیفون شدند.

از چهار محصول تجاری پروبیوتیکی شرکت پروتکسین آکواتک که به طور جداگانه مخلوط‌هایی از سوسپانسیون-های اسپورهای باسیلوس در آنها قرار داشت، مطابق با دستورالعمل موجود و با توجه به جدول ۱، این مخلوط-سازی انجام و مطابق به این جدول سوسپانسیونی با غلظت 1×10^{12} اسپور در هر میلی‌لیتر و با ترکیب گونه‌ای اسپور باسیلوس های ذکر شده در آن تهیه شد. این سوسپانسیون غنی‌سازی مطابق با دستورالعمل شرکت پروتکسین آکواتک با استفاده از سوسپانسیون اسپور مخلوط‌های باکتریایی تهیه شد. ابتدا مقادیر ۱۰،۲۰ و ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور را برداشته و به ۳ ظرف شیشه‌ای کاملاً استریل منتقل شدند. از آنجا که در سوسپانسیون مخلوط اسپورهای باسیلوس تهیه شده مطابق با جدول ۱ تعداد 1×10^{12} اسپور در هر میلی‌لیتر قرار داشت، با جداسازی حجم‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه توسط نمونه بردار در شرایط استریل، به ترتیب مقادیر 1×10^{10}، 2×10^{10} و 3×10^{10} اسپور جداسازی و به‌طور جداگانه به مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی لیتر، آب مقطر استریل اضافه شد. پس از آن، از محیط کشت اختصاصی این باکتری‌ها نیز به مقدار ۲۶، ۵۲ و ۷۸ میلی‌گرم توزین و به‌طور جداگانه به‌ترتیب به آن‌ها اضافه شد، مخلوط به‌دست آمده، پس از به‌هم زدن در دمای $37^{o}C$ انکوباسیون شد. در پایان مدت انکوباسیون، اسپورها در معرض محیط کشت خویش به باکتری‌های رویشی تبدیل شدند و سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه شده به‌طور جداگانه هر کدام به یک لیتر آب شور استریل (۳۰ ppt) اضافه شدند. سرانجام سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌ترتیب با غلظت‌های 1×10^{10}، 2×10^{10} و 3×10^{10} باکتری در هر لیتر تهیه شد. به منظور کنترل غلظت باکتری‌ها در سوسپانسیون‌های تهیه شده، از هر یک از آنها، رقت‌های سریالی در دامنه 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شد (Rengpipat et al. 1998). سپس توسط نمونه‌بردار تحت شرایط استریل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به پلت های حاوی محیط‌های کشت تریپتیک سوی آگار[1] (TSA) منتقل، و پس از کشت باکتریایی در دمای $37\ ^{o}C$ انکوباسیون شدند. سپس پرگنه‌های تشکیل شده شمارش و تعداد باکتری‌ها در هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی بر حسب CFU/mL تعیین شد (Makridis et al. 2001).

آماده‌سازی سوسپانسیون غنی‌سازی

سوسپانسیون باکتریایی مورد استفاده برای غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا، حاوی ۵ گونه از باسیلوس‌های پروبیوتیکی بوده که از مخلوط اسپور ۴ فرآورده تجاری میکروبی عرضه شده توسط شرکت نیکوتک (پروتکسین)[2] با به‌کارگیری محیط کشت اختصاصی آنها (پپتون، پلی ساکاریدها و مواد معدنی) به شرح جدول ۱ تهیه و استفاده شد.

---

[1] Teyptic soy agar

[2] Protexin

جدول ۱- باسیلوس های پروبیوتیکی (محصول شرکت پروتکسین) به کار رفته برای تهیه سوسپانسیون غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا اورمیانا.

باسیلوس های پروبیوتیکی	تعداد اسپور (CFU/mL) ×۱۰^۱۲
Bacillus subtilis	۱/۰۷۵
Bacillus circulans	۲/۵
Bacillus Polymyxa	۰/۸۲۵
Bacillus laterosporus	۱/۷۵
Bacillus licheniformis	۳/۸۲۵

غنی‌سازی ناپلیوس‌های آرتمیا و تغذیه لاروهای فیل ماهی

غلظت باکتری در سوسپانسیون باکتریایی غنی‌سازی برای مخلوط‌های باکتریایی به ترتیب در ۳ سطح ۱۰^۵ × ۱، ۱۰^۵ × ۲، CFU/mL ۱۰^۵ × ۳ ایجاد شد. ناپلیوس‌های آرتمیا اورمیانا بلافاصله پس از تخم گشایی در مرحله اینستار ۱ و با غلظت میلی‌لیتر/ ناپلیوس ۲۰۰ (۲ گرم به ازای هر لیتر) به ظروف شیشه‌ای قیفی شکل منتقل شدند. فرآیند غنی‌سازی[۳] در دمای ^{o}C ۱ ± ۳۰ و در شرایط هوادهی شدید، نور مناسب (۲۰۰۰ لوکس) و pH آب مصرفی ۰/۵ ± ۸ انجام شد (Gomez-Gil et al. 1998). طول مدت غنی‌سازی ۱۰ ساعت بود. میزان غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا بر مبنای ۵۰٪ وزن بدن لاروها در هر روز انجام می‌شد.

لارو سه روزه فیل ماهی با وزن متوسط حدود ۴۳/۲ میلی‌گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید مرجانی گرگان تهیه شد. طول دوره جذب کیسه زرده لارو فیل ماهی در حوضچه‌های ونیرو ۶ روز به طول انجامید. همزمان با شروع تغذیه فعال، وزن متوسط لاروها به ۴/۲۵ ± ۵۵/۳۰ میلی‌گرم رسید. در این مطالعه یک گروه شاهد و سه تیمار آزمایشی تحت تأثیر مخلوط پروبیوتیک‌های باسیلی با غلظت‌های مختلف غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا به ترتیب با عنوان تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. تغذیه لاروهای فیل ماهی در گروه شاهد از ناپلیوس‌های آرتمیا اورمیانای بدون غنی‌سازی با پروبیوتیک ها انجام شد. در تیمار ۱ از ناپلیوس‌های غنی شده با باسیلوس های پروبیوتیکی با غلظت سوسپانسیون باکتریایی CFU/mL ۱۰^۵ ×۱، در تیمار ۲ از CFU/mL ۱۰^۵×۲ و در تیمار ۳ از CFU/mL ۱۰^۵ ×۳ انجام شد. پرورش لاروهای ماهی در ۱۲ حوضچه پلاستیکی مدور به حجم ۵۰ لیتر (حجم آبگیری ۴۵ لیتر) انجام و در هر حوضچه تعداد ۲۰۰ قطعه لارو معرفی شدند. هوادهی این حوضچه‌ها توسط پمپ هوادهی الکتریکی انجام شد و میزان جریان آب در آنها یک لیتر در دقیقه بود که از آب ورودی به سالن ونیرو در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید مرجانی گرگان تأمین می‌شد.

ناپلیوس‌های غنی شده با سطوح مختلف مخلوط‌های پروبیوتیکی مذکور، به وسیله صافی با اندازه چشمه ۱۲۰ میکرون، فیلتر شده و پس از شستشو با آب مقطر استریل، به ترتیب برای تغذیه لاروهای فیل ماهی در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ استفاده شدند. تغذیه لاروهای فیل ماهی در تیمارهای شاهد و آزمایشی بر اساس ۵۰٪ وزن توده زنده آنها محاسبه،و روزانه در ۶ نوبت و با فاصله زمانی ۴ ساعت انجام شد. هر روزه در ساعت ۷ صبح ناپلیوس‌های خورده نشده و جمع شده در تورهایی با اندازه چشمه ۷۰ میکرون که در زیر خروجی هر حوضچه قرار داشت و آب خروجی را فیلتر می‌کرد و همچنین از طریق سیفون کردن کف حوضچه‌ها، ناپلیوس‌های مرده و خورده نشده، جمع‌آوری و به طریقه شمارش در واحد حجم، بیوماس آنها محاسبه و از مقدار بیوماس غذای زنده عرضه شده کسر می‌شد.

اندازه‌گیری پارامترهای کیفی آب

اکسیژن محلول، قابلیت هدایت الکتریکی، شوری و اسیدیته آب با استفاده از دستگاه واتر چکر مدل هانا، روزانه اندازه‌گیری شد. همچنین تعیین دمای آب نیز در هر روز در سه نوبت انجام شد.

معیارهای رشد

در طول دوره آزمایش با توجه به رشد سریع لاروهای فیل ماهی و به منظور تعیین مقدار جیره روزانه بر اساس بیوماس آنها، هر روز تعداد ۱۰ قطعه لارو ماهی از هر حوضچه پرورشی نمونه‌برداری و میانگین طول و وزن آنها

[۳] Bioencapsulation

با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر و ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم اندازه‌گیری شده و دوباره به حوضچه‌ها بازگردانده می‌شدند. در انتهای دوره پرورش که روز چهاردهم آزمایش بود، تمامی لاروهای پرورشی در هر حوضچه نمونه‌برداری و طول و وزن آنها اندازه‌گیری شد. همچنین ضریب تبدیل غذایی (Hevroy et al. 2005) با کسر نمودن بیوماس غذای (ناپلیوس های آرتمیا) خورده نشده از کل غذای عرضه شده که در بخش تغذیه لاروهای فیل ماهیان توضیح داده شد، محاسبه شد (Hevroy et al. 2005). معیارهای رشد شامل نرخ رشد ویژه (Hevroy et al. 2005)، فاکتور وضعیت (Austreng, 1978)، میانگین رشد روزانه (De Silva and Anderson, 1995)، نرخ وزن نسبی به‌دست آمده، افزایش وزن (Tacon, 1990)، ضریب رشد حرارتی (Cho, 1992) و غذای نسبی خورده شده (De Silva and Anderson, 1995) تعیین شد. سرعت رشد وزنی، سرعت رشد طولی، ضریب تغییرات وزنی و ضریب تغییرات طولی (De Silva and Anderson, 1995) محاسبه شد. در طول دوره آزمایش درصد بقای لاروهای فیل ماهی نیز تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در تیمارهای ذکر شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ولیک و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ انجام شد. همچنین همبستگی بین غلظت‌های مختلف به‌کارگیری مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی با برخی از شاخص‌های رشد لاروهای فیل ماهی را با استفاده از آزمون پیرسون تعیین و از بسته نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۹) و Excel در محیط ویندوز استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که هیچ تأثیر آشکاری از پروبیوتیک‌ها بر روی کیفیت آب در سه تیمار آزمایشی نسبت به شاهد مشاهده نشد. معیارهای فیزیکوشیمیایی از جمله اکسیژن محلول (۰/۵۶ ± ۶/۷۲ ppm)، دما (۱/۴۴ ± ۱۸/۴۸ ^{o}C)، شوری (۰/۴۸ ± ۰/۶۳ ppt)، قابلیت هدایت الکتریکی (۱۶۳۶/۷۵ ± ۳۸۰/۵۱ × ۱۰$^{-۶}$ mhos/cm) و اسیدیته (۰/۳۸ ± ۷/۸۲) در شرایط پایدار و قابل قبول قرار داشتند.

نرخ بقای لاروهای فیل ماهی در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین میزان بقا در تیمار آزمایشی ۲ و معادل ۴/۳۱ ± ۸۴٪/۵۰ به دست آمد و افزایشی معادل ۱۴/۸٪ را نشان داد. تأثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر مصرف غذا، کارآیی و معیارهای رشد در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج این آزمایش بر روی لاروهای فیل ماهی تغذیه کرده از ناپلیوس آرتمیا اورمیانای غنی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی، نشان داد که پروبیوتیک ها توانستند به طور موفقیت‌آمیزی فاکتورهای رشد را در لاروهای فیل ماهی تغییر داده و باعث ارتقای آنها شوند (جدول ۲).

در پایان دوره آزمایش، میانگین وزن نهایی گروه شاهد (۳۲ ± ۲۱۷/۷۱ میلی‌گرم) در مقایسه با تیمارهای آزمایشی ۱، ۲ و ۳ (۳۳ ± ۲۴۴/۲۸، ۲۱ ± ۲۳۵/۴۴ و ۳۰ ± ۲۳۴/۹۴ میلی‌گرم) پایین تر بود و اختلاف معنی‌دار بین آنها مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین وزن لارو ماهی (۲۴۴/۲۸ میلی‌گرم) در تیمار ۱ که از آرتمیای غنی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی (غلظت ۱×۱۰^{۵} CFU/mL) تغذیه کرده بودند، به دست آمد. بین تیمارهای آزمایشی (تیمارهای ۱، ۲ و ۳) اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

همچنین، میانگین رشد روزانه در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد در حد معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). این معیار در تیمار ۱ در بالاترین سطح (۵/۷۳ ± ۳۸٪/۸۵) و در تیمار شاهد در پایین‌ترین سطح (۵/۴۲ ± ۳۳٪/۵۴) قرار داشت.

نرخ رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان رشد ویژه در تیمار ۱ (۲/۲۹ ± ۱۲/۹۵) و کمترین در گروه شاهد (۲/۴۵ ± ۱۱/۷۶) به‌دست آمد، در حالی که این معیار در لاروهای ماهی تیمار ۳ نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ کاهش یافت. هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

غذای نسبی خورده شده لاروهای فیل ماهی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد در حد معنی‌دار کاهش

یافت (P<۰/۰۵) و کمترین مقدار آن در تیمار ۱ معادل ۷/۶۳ ± ۵۱٪/۴۲ به دست آمد. بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

باسیلوس‌های پروبیوتیکی باعث افزایش وزن نسبی به دست آمده در لاروهای فیل ماهی در تیمارهای تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها شدند، به طوری که این معیار در تیمار شاهد (۵۴/۲ ± ۳۳۵٪/۴) نسبت به تیمارهای آزمایشی در حد معنی‌دار پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت (P>۰/۰۵) و بیشترین مقدار در تیمار ۱ (۵۷/۳ ± ۳۸۸/۵۵) مشاهده شد.

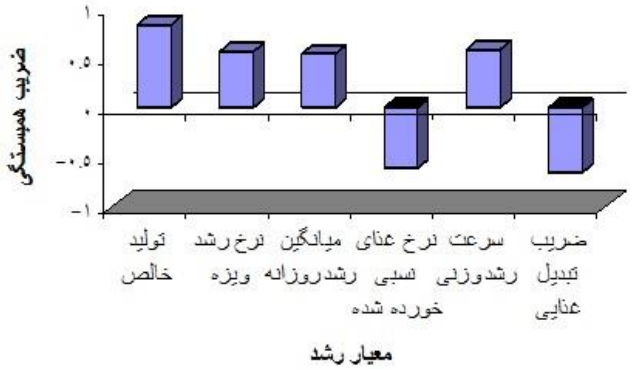
فاکتور وضعیت اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای آزمایشی ۱ و ۲ نسبت به شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین مقدار این معیار رشد در تیمار ۲ (۰/۱۳ ± ۰/۷۷) مشاهده شد، در حالی که در تیمار ۳ این پارامتر به حداقل خود رسید ولی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). ضریب رشد حرارتی در لاروهای فیل ماهی تغذیه کرده از ناپلیوس‌های غنی شده با پروبیوتیک ها نسبت به گروه شاهد در حد معنی‌دار افزایش یافت (P<۰/۰۵). این ضریب از ۰/۲۶ ± ۱/۲۳ در تیمار شاهد به ۰/۲۵ ± ۱/۳۶ در تیمار ۱ ارتقا یافت.

ضریب تبدیل غذایی که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تغذیه‌ای است، با به‌کارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در این آزمایش به طور قابل توجهی کاهش یافت (جدول ۲) و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). کمترین آن برای تیمار ۱ معادل ۲/۷۷ به دست آمد، در صورتی که در گروه شاهد این معیار ۳/۴۵ تعیین شد.

باسیلوس‌های پروبیوتیکی در تیمارهای آزمایشی باعث افزایش سرعت رشد وزنی و طولی در لاروهای فیل ماهی شدند. سرعت رشد وزنی در تیمارهای آزمایشی به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین مقدار (۱/۳۶۰ ± ۱۲/۹۶) در تیمار ۱ به دست آمد. همچنین تیمارهای آزمایشی نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان ندادند (P>۰/۰۵). درباره ضریب تغییرات وزنی، کمترین مقدار در تیمار ۲ (۰/۰۲ ± ۱۷٪/۶۵) و بیشترین آن در تیمار شاهد (۳/۰۳ ± ۲۱٪/۳۴) به دست آمد، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

سرعت رشد طولی لاروهای فیل ماهی در تیمارهای آزمایشی بیش از تیمار شاهد بود، ولی فقط تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین سرعت رشد طولی در لاروهای فیل ماهی در تیمار ۳ (۰/۷۴ ± ۴/۹۰٪) و کمترین آن در گروه شاهد (۱/۰۰ ± ۴٪/۵۲) به‌دست آمد. باسیلوس‌های پروبیوتیکی باعث شدند که ضریب تغییرات طولی در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد کاهش یابد و از ۱۱/۰۸ ± ۱۰٪/۱ در تیمار شاهد به ۷۲/۰۱ ± ۶/۱ در تیمار ۲ کاهش یابد.

ضرایب همبستگی مطابق با تست همبستگی پیرسون برای تولید خالص ماهی r=۰/۸۴ ، P=۰/۰۱ و نرخ رشد ویژه r=۰/۵۷، P=۰/۰۱، میانگین رشد روزانه r=۰/۵۴، P=۰/۰۱ و سرعت رشد وزنی r=۰/۵۹، P=۰/۰۱ به دست آمد، در حالی که همبستگی منفی معنی‌داری بین تعداد باسیلوس‌های سوسپانسیون غنی‌سازی با نرخ غذای نسبی خورده شده و همچنین، ضریب تبدیل غذایی وجود داشت. مطابق با تست همبستگی پیرسون، این ضرایب همبستگی برای این دو پارامتر به‌ترتیب معادل r=-۰/۶۱، P=۰/۰۱ و r=۰/۶۴، P=۰/۰۵ به دست آمد (شکل ۱) .



شکل ۱- ضرایب همبستگی بین ضریب تبدیل غذایی، معیارهای رشد و غلظت باسیلوس های سوسپانسیون محیط غنی‌سازی.

جدول ۲- پارامترهای رشد لارو فیل ماهی تغذیه شده با ناپلیوس‌های آرتمیا اورمیانای غنی شده با مخلوط‌های پروبیوتیکی تغذیه لاروهای فیل ماهی (گروه شاهد ناپلیوس‌های آرتمیا اورمیانای بدون غنی‌سازی با پروبیوتیک ها، تیمارهای ۱، ۲ و ۳ ناپلیوس‌های غنی شده با باسیلوس های پروبیوتیکی با غلظت های سوسپانسیون باکتریایی به ترتیب ۱×۱۰^{۵} CFU/mL، ۲×۱۰^{۵} CFU/mL و ۳×۱۰^{۵} CFU/mL).

معیار	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
	تیمار			
وزن اولیه (mg)	۵۵/۳۰ ± ۰/۶۵	۵۵/۳۰ ± ۰/۶۵	۵۵/۳۰ ± ۰/۶۵	۵۵/۳۰ ± ۰/۶۵
طول اولیه (mm)	۱۹/۵۰ ± ۰/۵۲	۱۹/۵۰ ± ۰/۵۲	۱۹/۵۰ ± ۰/۵۲	۱۹/۵۰ ± ۰/۵۲
وزن نهایی (mg)	۲۱/۷۱ ± ۳۲^{b}	۲۴/۲۸ ± ۳۳^{a}	۲۳/۴۴ ± ۲۱^{a}	۲۳ /۹۴ ± ۳۰^{a}
طول نهایی (mm)	۳۱/۰۹ ± ۳/۱۹^{b}	۳۱/۷۵ ± ۲/۸۷^{ab}	۳۱/۳۶ ± ۲/۱۲^{b}	۳۲/۲۹ ± ۲/۵۹^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۳/۴۵ ± ۰/۵۷^{a}	۲/۷۷ ± ۰/۵۵^{b}	۲/۸۴ ± ۰/۴۲^{b}	۲/۹۳ ± ۰/۵۲^{b}
نرخ رشد ویژه (٪ در روز)[۱]	۱۱/۷۶ ± ۲/۴۵^{b}	۱۲/۹۵ ± ۲/۲۹^{a}	۱۲/۶۷ ± ۱/۸۴^{a}	۱۲/۶۴ ± ۲/۱۲^{a}
غذای نسبی خورده شده (٪)[۲]	۶۰/۸۳ ± ۱۲/۷۳^{a}	۵۱/۴۲ ± ۷/۶۳^{b}	۵۲/۳۳ ± ۵/۱۵^{b}	۵۳/۰۸ ± ۶/۴۹^{b}
کارآیی تبدیل رشد (٪)[۳]	۲۲/۹۱ ± ۴/۲۷^{b}	۲۸/۷۹ ± ۵/۳۱^{a}	۲۶/۴۷ ± ۳/۱۹^{a}	۲۶/۷۸ ± ۴/۳۰^{a}
میانگین رشد روزانه (٪) [۴]	۳۳/۵۴ ± ۵/۴۲^{b}	۳۸/۸۵ ± ۵/۷۳^{a}	۳۷/۰۸ ± ۴/۲۵^{a}	۳۷/۱۸ ± ۵/۸۹^{a}
نرخ وزن نسبی به دست آمده (٪) [۵]	۳۳/۴ ± ۵۴/۲^{b}	۳۸۸/۵۵ ± ۵۷/۳^{a}	۳۷۰/۸۸ ± ۴۲/۵^{a}	۳۷/۸۹ ± ۵۸/۹^{a}
فاکتور وضعیت[۶]	۰/۷۲ ± ۰/۱۲^{ab}	۰/۷۶ ± ۰/۱۵^{a}	۰/۷۷ ± ۰/۱۳^{a}	۰/۷۰ ± ۰/۱۱^{b}
بقا (٪)	۶۹/۷۰ ± ۳/۴۶^{b}	۷۷/۴۳ ± ۴/۲۵^{ab}	۸۴/۵۰ ± ۴/۳۱^{a}	۷۸/۶۷ ± ۸/۸۴^{ab}
ضریب رشد حرارتی[۷]	۱/۲۳ ± ۰/۲۶^{b}	۱/۳۶ ± ۰/۲۵^{a}	۱/۳۳ ± ۰/۲۰^{a}	۱/۳۳ ± ۰/۲۳^{a}
سرعت رشد وزنی[۸]	۱۲/۲۳ ± ۱/۵۵^{b}	۱۲/۹۶ ± ۱/۳۶^{a}	۱۲/۸۴ ± ۱/۱۲۱^{a}	۱۲/۷۹ ± ۱/۲۶^{a}
ضریب تغییرات وزنی[۹]	۲۱/۳۴ ± ۳/۰۳^{a}	۲۱/۶۱۷ ± ۳/۷۴^{a}	۱۷/۶۵ ± ۰/۰۲^{a}	۲۰/۳۷ ± ۱/۹^{a}
سرعت رشد طولی[۱۰]	۴/۵۲ ± ۱/۰۰^{b}	۴/۷۳ ± ۰/۸۶^{ab}	۴/۶۳ ± ۰/۶۴^{b}	۴/۹۰ ± ۰/۷۴^{a}
ضریب تغییرات طولی[۱۱]	۱۰/۱۱ ± ۱/۰۸^{a}	۸/۸۸ ± ۱/۷۷^{ab}	۶/۷۲ ± ۱/۰۱^{b}	۸/۰۵ ± ۱/۶۵^{ab}

حروف لاتین غیرمشترک نشانه معنی‌دار بودن است ($P<۰/۰۵$).

۱- نرخ رشد ویژه = ۱۰۰ ×[دوره پرورش (روز)/ لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی – لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی]

۲- غذای نسبی خورده شده = ۱۰۰×[(زمان (روز) ×(گرم وزن اولیه ماهی – گرم وزن نهایی ماهی) ۰/۵ / غذای خورده شده]

۳- کارآیی تبدیل رشد (٪) = ۱۰۰ ×[غذای نسبی خورده شده / نرخ رشد ویژه]

۴- میانگین رشد روزانه (٪) = ۱۰۰ ×[(زمان (روز)× گرم وزن اولیه/ گرم وزن اولیه – گرم وزن نهایی ماهی)]

۵- نرخ وزن نسبی به دست آمده = ۱۰۰ ×[گرم وزن اولیه ماهی / (گرم وزن نهایی ماهی– گرم وزن نهایی ماهی)]

۶- فاکتور وضعیت = ۱۰۰ × [(۳طول ماهی (سانتیمتر) / وزن ماهی (گرم))]

۷- ضریب رشد حرارتی ۱۰۰ ×[(مجموع میانگین درجه حرارت‌های روزانه/ گرم وزن توده زنده اولیه ماهی– گرم وزن توده زنده ثانویه ماهی)]

۸- سرعت رشد وزنی = ۱۰۰ ×[(گرم وزن اولیه ماهی + گرم وزن نهایی ماهی) × طول دوره(روز)/ (گرم وزن اولیه ماهی - گرم وزن نهایی ماهی)×۲]

۹- ضریب تغییرات وزنی =۱۰۰ × [گرم میانگین وزن نهایی ماهی/انحراف معیار وزن نهایی ماهی (گرم)]

۱۰- سرعت رشد طولی = ۱۰۰ ×[(طول اولیه ماهی (سانتیمتر) + طول نهایی ماهی (سانتیمتر))× طول دوره (روز)/(طول اولیه ماهی (سانتیمتر) - طول نهایی ماهی(سانتیمتر))× ۲]

۱۱- ضریب تغییرات طولی=۱۰۰ × [میانگین طول نهایی ماهی (سانتیمتر) / انحراف معیار طول نهایی ماهی (سانتیمتر)]

بحث

تمامی تیمارهای مورد تغذیه با ناپلیوس‌های غنی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی منجر به کارآیی رشد و مصرف غذایی بهتری نسبت به گروه شاهد شدند. تحقیقات نشان داده است که پروبیوتیک‌های باسیلی از طریق فعالیت‌های متابولیک خویش در دستگاه گوارش لاروهای آبزیان موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شده و در نتیجه، با هضم و جذب بهتر مواد غذایی خورده شده توسط لارو آبزی موجب ارتقای فاکتورهای رشد در آنها می‌شوند (Jafaryan et al. 2009a). یافته‌های محققان بیانگر این موضوع است که باسیلوس‌های پروبیوتیکی با ترشح برخی ترکیبات خارج سلولی باعث تحریک دستگاه ایمنی در لاروهای آبزیان شده و مقاومت ماهی را در مقابل عوامل بیماری‌زا و استرس‌های محیطی افزایش می دهند و در نتیجه، میزان بقا در آنها افزایش مییابد (Gatesoupe, 1991). فرآیند غنی‌سازی روشی بسیار سودمند و با کارآیی مناسب در انتقال پروبیوتیک‌های مختلف به دستگاه گوارش آبزیان است که در بسیاری از گونه‌های آبزیان پرورشی برای افزایش وزن و عملکرد تغذیه‌ای و پرورشی آنها و نیز مقابله با عوامل بیماری‌زا برای افزایش بقای آبزیان پرورشی در جهان استفاده شده است (Talpur et al. 2012). در همین راستا، Talpur و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که غنی‌سازی ناپلیوس‌های *A. franciscana* و روتیفر *Brachionus plicatilis* موجب افزایش رشد و درصد بقای لاروهای خرچنگ شناور آبی (*Portunus pelagicus*) می‌شود. نتایج مشابهی را Sivagnanavelmurugan و همکاران (۲۰۱۵) در غنی‌سازی ناپلیوس‌های آرتمیا فرانسیسکانا با پری‌بیوتیک-ها در افزایش رشد و بقای میگوی ببری (*Penaeus monodon*) به دست آوردند.

در مطالعه حاضر، وزن نهایی ماهیان در انتهای دوره آزمایش در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد و بیشترین مقدار آن در تیمار ۱ (لاروهای تغذیه شده از ناپلی غنی شده با سوسپانسیون غنی‌سازی در غلظت CFU/mL ۱۰^۵ ×۱) به دست آمد، در حالی که افزایش پروبیوتیک ها در در تیمار ۳ (لاروهای تغذیه شده از ناپلی غنی شده با سوسپانسیون غنی‌سازی در غلظت CFU/mL ۱۰^۵ ×۳) موجب افزایش معیارهای رشد نشد. چنین نتایجی را Ghosh و همکاران (۲۰۰۳) درباره ماهیان انگشت قد روهو (*Labeo rohita*) به دست آوردند که از جیره‌های مکمل شده با غلظت‌های متفاوتی از *B. circulans* تغذیه کرده بودند. نتایج مشابهی همسو با یافته‌های این تحقیق توسط Jafaryan و همکاران (۲۰۰۹b) در خصوص غنی‌سازی ناپلیوس های آرتمیا اورمیانا در پرورش لارو ماهی سازان (*Cyprinus carpio carpio*) به دست آمد.

در بررسی حاضر، میزان بقای لاروهای فیل ماهی در تیمارهای غنی شده با پروبیوتیک‌های باسیلی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت و بالاترین میزان درصد بقا در تیمار ۲ معادل ۸۴/۵٪ تعیین شد، در حالی که در گروه شاهد ۶۹/۷٪ بود. اصولاً تحقیقات نشان می‌دهد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی با ترشح برخی ترکیبات خارج سلولی نظیر باکتری‌کش‌ها و نیز تحریک دستگاه ایمنی میزبان موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در آنها میشوند. در موافقت با یافته‌های تحقیق حاضر، Touraki و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که غنی‌سازی

ناپلیوس‌های آرتمیا فرانسیسکانا با باسیلوس سابتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم و به‌کارگیری این ناپلیوس‌های غنی‌شده در تغذیه لارو ماهی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) باعث افزایش میزان بقا در آنها شد، به طوری که درصد بقا از ۳۶/۷٪ در گروه شاهد به ۸۶/۷٪ در تیمارهای تغذیه شده با ناپلیوس های غنی‌شده با پروبیوتیک‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین این محققان دریافتند که این فرآیند غنی‌سازی بر شاخص-های رشد این ماهی از جمله وزن نهایی، نرخ رشد ویژه و غیره تأثیر داشت. جمالی و همکاران (۱۳۹۴) با استفاده از مخلوط باسیلوس‌های پروبیوتیکی در تغذیه لاروهای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و ماهی سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) از ناپلیوس های آرتمیا فرانسیسکانا، آرتمیا اورمیانا و *A. parthenogenetica* استفاده کردند که با افزایش وزن ، نرخ رشد، کاهش ضریب تغذیه غذایی و افزایش کارآیی تغذیه همراه بود و با یافته‌های تحقیق حاضر همسویی داشت.

باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس سرئوس و *B. pumilus* ایزوله شده از روده ماهی روهو نشان دادند که این باکتری‌ها قابلیت بسیار خوبی در هضم ماده غذایی در روده ماهی داشته و میزان بهره‌برداری از غذا را افزایش می‌دهند (Bairagi et al. 2004). نتایج مشابهی را Carnevali و همکاران (۲۰۰۴) در به کارگیری باکتری *Lactobacillus fructivorans* و *Lactobacillus plantarum* از طریق غنی‌سازی با ناپلیوس‌های *A. franciscana* در رشد و نمو شانک ماهی (*Sparus aurata*) در پرورش لاروی آنها به دست آوردند.

این فاکتورها در تیمارهای آزمایشی نسبت به لاروهای گروه شاهد بهبود یافت، در حالی که در تیمار ۳ نسبت به دو تیمار آزمایشی ۱ و ۲ که از ناپلیوس‌های غنی شده با غلظت بالاتری از مخلوط پروبیوتیکی غنی‌سازی شده بودند، شاخص‌های ذکر شده کاهش یافتند، ولی در هر حال این شاخص‌ها در تیمار فوق‌الذکر نسبت به شاهد در وضعیت بهتری قرار داشتند. لذا مشخص شد که افزایش سطوح پروبیوتیک‌های مورد استفاده در همه حال باعث ارتقای بیشتر شاخص‌های رشد نمی‌شود (Faramarzi et al. 2011). چنین نتایجی را Ghosh و همکاران (۲۰۰۳) و Bairagi و همکاران (۲۰۰۴) در به کارگیری جیره‌های مکمل شده با *Bacillus circulans* و *Bacillus subtilis* در تغذیه لاروهای این ماهی به دست آوردند. باسیلوس سیرکولانس ایزوله شده از روده ماهی پس از افزون‌سازی از طریق کشت باکتریایی، مجدداً طی مکمل‌سازی با غلظت‌های مختلف در جیره‌های غذایی نوزاد این ماهی به‌کار رفته و باعث افزایش رشد و بقای آنها شد (Ghosh et al. 2004). اسپور *Bacillus toyoi* به کار رفته در غنی‌سازی با روتیفر نشان داد که این باسیلوس پروبیوتیکی تأثیر بسیار مثبتی بر روی فاکتورهای رشد و بقای لارو ماهیان توربوت (*Scophthalmus maximus*) داشت (Gatesoupe, 1991).

باسیلوس‌های پروبیوتیکی باعث افزایش فعالیت‌های متابولیک خارج سلولی مانند فعالیت‌های آمیلولیتیک، پروتئولیتیک و هضم غذای مصرفی توسط لارو آبزی شده و منجر به افزایش عملکرد رشد می‌شوند. در تحقیق حاضر، عملکرد رشد با حضور باسیلوس‌های پروبیوتیکی در ناپلیوس‌های غنی شده مورد تغذیه لاروهای ماهی آشکار شد. در همین راستا Jamali و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که غنی‌سازی ناپلیوس‌های آرتمیای پارتنوژنز با پروبیوتیک‌های باسیلی موجب افزایش رشد و بقا در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می شود.

از جمله تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها، افزایش بازماندگی لاروهای آبزیان بوده و فرضیه‌هایی وجود دارد که پروبیوتیک‌های باسیلی در بهبود دستگاه ایمنی میزبان و افزایش بقای لاروهای آبزیان نقش به‌سزایی دارند (Gatesoupe, 1991). در تحقیق حاضر، درصد بقا در تیمارهای آزمایشی در حد معنی‌دار افزایش یافت. نتایج مشابهی را Jafaryan و همکاران (۲۰۰۸) در پرورش لارو ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) هنگام تغذیه از ناپلیوس‌های غنی شده با پروبیوتیک‌های باسیلی به دست آوردند. Gatesoupe (۱۹۹۱) درخصوص تغذیه لارو ماهی توربوت با روتیفر *Branchionus plicatilis* غنی شده با اسپور *Bacillus toyoi* دریافت که این

باسیلوس در طی ده روز می‌تواند درصد بقای ماهی را به طور معنی‌داری از ۲۹٪ به حدود ۴۰٪ افزایش دهد.

در تحقیق حاضر، پروبیوتیک‌های به‌کار رفته باعث شدند که سرعت رشد وزنی و طولی افزایش یافته و همچنین، ضرایب تغییرات وزنی و طولی کاهش یابد. این امر نشان‌دهنده آن است که لاروهای فیل ماهی متأثر از پروبیوتیک‌ها، جمعیت یکسان‌تری از نظر وزن و اندازه طول بدن نسبت به گروه شاهد داشتند. نتایج این مطالعه مشخص کرد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی توانایی بسیار خوبی را در افزایش عملکرد شاخص‌های رشد و میزان بقای لاروهای فیل ماهی دارند.

منابع

جمالی، ه.، جعفریان، ح.، ناظریان، س. آراملی، م.ص. ۱۳۹۴. تأثیر باسیلوس های پروبیوتیکی بر کارآیی رشد و تغذیه لارو کپور معمولی، کپور علفخوار و کپور سرگنده تغذیه شده از گونه‌های مختلف ناپلی آرتمیا. فصلنامه علمی-پژوهشی علوم و فنون شیلات ۲: ۴۳-۲۷.

Austreng, E. 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. Aquaculture 13: 265-272.

Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K., Ray, A.K. 2004. Evaluation of the nutritive value of *leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *labeo rohita* (Hamiltion) fingerlings. Aqucalture Research 35: 436-446.

Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizo, P., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M., Cresci, A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellenss during development. Aquaculture International 12: 377-386.

Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Nelis, H., Deleen Heer, A.P., Sorgeloose, P. 1991. Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture II. A case study with European sea bass. In Fish and crustacean larviculture symposium. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication No. 15.

Cho, C.Y. 1992. Feeding systems for rainbow trout and other salmonidswith reference to current estimates of energy and protein requirements. Aquaculture 100: 107-123.

De Silva, S.S., Anderson, T.A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman and Hall, London. 319 p.

Faramarzi, M., Jafaryan, H., Patimar, R., Iranshahi, F., Lashkar Boloki, M., Farahi, M., Kiaalvandi, S. 2011. The effects of different concentrations of probiotic *Bacillus* spp. and different bioencapsulation times on growth performance and survival rate of Persian sturgeon (*Acipencer persicus*) larvae. World Journal of Fish and Marine Sciences 3: 145-150.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Microbiology 66: 365-378.

Gatesoupe, F.J. 1991. *Bacillus* sp. spores: A new tool against early bacterial infection in turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. In Fish and crustacean larviculture symposium. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society, Ghent, 409-411, Special Publication No. 24.

Gatesoupe, F.J. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

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: 13-21.

Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. 2004. Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) spawn feed diets formented with intestine bacterium, *Bacillus circulans*. Acta Ichthyologica et Piscatoria 34: 155-165.

Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Aberu-Grobis, F.A., Roque, A. 1998. Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia fransiscana*). Applied Environmental Microbiology 64: 2318-2322.

Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., Hemre, G.I. 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition 11: 301-313.

Jafaryan, H., Asadi, R., Bagheri, A. 2008. The promotion of growth parameters and feeding efficiency of *Acipenser nudiventris* larvae by using of probiotic bacillus via bioencapsulation of *Artemia urmiana*. Aquaculture Europe 2008, Krakow, Poland, 15-18 September, 7-9.

Jafaryan, H., Habibi Rezaei, M., Ghamsary, M. 2009a. The role of bioencapsulated *Artemia urmiana* nauplii with probiotic *Bacillus* sp. on the enhancement of digestive-enzymes activity in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. International Symposium /Workshop on Biology and Distribution of Artemia. December13-14, Urmia, Iran, 265-269.

Jafaryan, H., Golpor, A., Adibi, M. 2009b. The promotion of growth parameters in Sazan (*Cyprinus carpio carpio* L.) larvae by bioencapsulation of *Artemia urmiana* with probiotics. 2009. Aqucultue Europe 2009. August 14-17, Trondheim, Norway. 284-285.

Jamali, H., Tafi, A.A., Jafaryan, H., Patimar, R. 2014. Effect of Enriched *Artemia parthenogenetica* with Probiotic (*Bacillus* spp.) on growth, survival, fecal production and nitrogenous excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Journal of Fisheries and Livestock Production 2: 2-6.

Lloyd, A.B., Comming, R.B., Kent, R.D. 1997. Preventation of *salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poultry with intestinal extracts. Australian Veterinary Journal 53: 82-87.

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.

Nogami, K., Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Protunus tritubercu latus*. Canadian Jornal of Fisheries and Aquatic Sciences. 49: 2373-2376.

Olsen, Y. 1997. Larval rearing technology of marine species in Norway. Hydrobiologia 358: 27-36.

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.

Savage, D.C. 1989. The normal human microflora composition. In: Grubb, T., Midtvedt, T., Norin, E. The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora. The Palgrave Macmillan Press Ltd., Houndsmills, 448P.

Sivagnanavelmurugan, M., Karthik Ramnath, G., Palavesam, A., Mmanuel, G. 2015. Effect of *Sargassum wightii* fucoidan on growth and disease resistance to Vibrio parahaemolyticus in *Penaeus monodon* post-larvae. Aquaculture Nutrition 21: 960-969.

Skjermo, J., Vadstein, O. 1999. Techniques for the microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture 177: 333-343.

Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Mesa, M., Persoone, G. 1977. Decapsulation of artemia cysts: a simple

technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture 12: 311-315.

Tacon, A.G.J. 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press, 424p.

Talpur, A.D., Memon, A.J., Khan, M.I., Ikhwanuddin, M. 2012. Effects of *Lactobacillus* probiotics on the enhancement of larval survival of *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) fed via bioencapsulated in live feed. World Journal of Fish and Marine Sciences 4: 42-49.

Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P., Chrysi, K. 2012. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in Artemia nauplii against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 2425-2433.

Tovar-Ramirez, D., Zombonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234: 415-427.

Changes in growth factors of Beluga, *Huso huso* larvae fed with bioencapsulated *Artemia* enriched by a probiotic, protexin

Samira Gafarian[1], Mina Rangraz[2], Hojatollah Gafarian[1], Noormohammad Makhtomi[3], Abdorahman Davoodipour[3]

1- Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavoos, Gonbad Kavoos, Golestan, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Science, University of Gonbad Kavoos, Gonbad Kavoos, Golestan, Iran
3- Agh Ghala Sturgeon Center, Gonbad Kavoos, Golestan, Iran

Received 29 April 2016; accepted 4 September 2016

Abstract

Artemia urmiana nauplii were used as a vector in bioencapsulation processing to carry blends of five probiotic bacilli called Protexin aquatic, including *Bacillus circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus* and *B. Polymyxa* to digestive system of Beluga *Huso huso* larvae. Nauplii were bioencapsulated with three concentrations of 1×10^5 (T_1), 2×10^5 (T_2) and 3×10^5 (T_3) bacteria per mililiter in suspension and were fed to Beluga larvae for 10 hours. The larvae were fed on the base of the 50% of their body weight for 6 times a day in a completely randomized design and the results were compared with control group (unbioencapsulated *Artemia* nauplii) in fourteenth day of experiment. The results suggest a positive effect of probiotic bacillus on growth of Beluga larvae compared to the control group. The highest weight was obtained in fish fed by bioencapsulated *Artemia* with a concentration of 1×10^5 bacteria/mL. . Food conversion rate significantly decreased in experimental treatments. The probiotic bacilli had significant positive effects on the specific growth rate, relative gain ratio, survival rate, average daily growth and thermal growth coefficient in comparison with control ($P<0.05$). However, condition factor did not show any significant difference ($P>0.05$). The results showed that probiotic bacilli have the highest ability in increasing the growth of Beluga larvae and fish fed by bioencapsulated *Artemia* with a concentration of 1×10^5 bacteria/mL had the best results.

Keyword: Probiotic protexin, Beluga, Bioencapsulation, *Artemia* nauplii, Specific growth rate, Thermal growth coefficient

*Corresponding author: Samira.jafaryan@gmail.com