شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۷

ص ۲۸۷-۲۹۸

بررسی تأثیر باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در شاخص‌های رشد، بازماندگی و فلور میکروبی دستگاه گوارش لارو ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) با شیوه‌های رسانش مختلف

❖ **سعید ضیایی‌نژاد*:** استادیار دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان، دانشکدهٔ منابع طبیعی، گروه شیلات، بهبهان، ایران
❖ **غلامرضا رفیعی:** استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **علیرضا میرواقفی:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **حمید فرحمند:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

در این تحقیق تأثیر دو باکتری باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis* BP6) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum* LP3) در شاخص‌های رشد، بازماندگی و فلور میکروبی رودهٔ لارو ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) با شیوه‌های غنی‌سازی آرتمیا و استفاده در آب ارزیابی شد. برای هر باکتری سه تیمار در نظر گرفته شد. در تیمار اول باکتری‌ها تنها از طریق آرتمیای غنی‌سازی‌شده با باکتری مورد نظر در اختیار لاروها قرار گرفتند، در تیمارهای دوم و سوم باکتری‌ها به ترتیب با تراکم 10^3 و 10^6 سلول در میلی‌لیتر به آب محیط پرورش لاروها افزوده شدند. نتایج نشان داد که هر دو باکتری BP6 و LP3 توانستند شاخص‌های رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک *A.latus* را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری بهبود بخشند ($p<0/05$). هر دو باکتری توانستند با روندی تقریباً ثابت و با شیب افزایشی کمی استقرار قابل قبولی هم در آب و هم در دستگاه گوارش داشته باشند.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، باسیلوس سابتیلیس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شانک زرد باله، فلور میکروبی.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۶۱۵۲۷۲۱۱۹۰ دورنگار: ۰۶۱۵۲۷۲۱۱۹۰ Email: zbsaeed@yahoo.com

۱. مقدمه

در دهۀ گذشته تحقیقات گسترده‌ای دربارۀ استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری انجام شده است. گسترش کنترل‌نشدۀ جوامع میکروبی در مراکز تکثیر آبزیان دریایی یکی از دلایل عمدۀ نتایج نامطلوب و پیش‌بینی‌ناپذیر است؛ بنابراین فعالیت‌های کنترل میکروبی با استفاده از پروبیوتیک‌ها ممکن است اثر سودمندی در عملکرد مراکز تکثیر داشته باشد.

Kennedy *et al.* (1998) نشان دادند که افزودن پروبیوتیکی حاوی یک باکتری گرم مثبت (*Bacillus subtilis*) بازماندگی و رشد لارو ماهیان دریایی را افزایش داد. به علاوه، Gildberg *et al.* (1997) توانستند مقاومت بچه‌ماهیان کاد را در برابر *V.anguillarum* با خوراندن باکتری اسید لاکتیکی (*Carnobacterium divergens*) به آن‌ها افزایش دهند.

پروبیوتیک‌ها حتی در سرعت تکامل لارو ماهی تأثیر مثبتی دارند (Avella *et al.*, 2010). آن‌ها نشان دادند که تحت تأثیر *Lactobacillus rhamnosus* رشد و سرعت تکامل لارو دلقک‌ماهی (*Amphiprion ocellaris*) افزایش یافت.

Lara-flores *et al.* (2003) نیز از دو پروبیوتیک *Streptococcus faecium* و *Lactobacillus acidophilus* در جیرۀ بچه‌ماهی تیلاپیای نیل استفاده کردند و افزایش درصد بازماندگی، نرخ رشد ویژه[1]، نسبت کارایی پروتئین و قابلیت هضم ظاهری پروتئین و در نتیجه کاهش ضریب تبدیل غذایی را مشاهده کردند. Carnevali *et al.* (2004) باکتری *Lactobacillus fructivorans* را از رودۀ ماهی شانک جدا کردند و طی تکامل رشد این ماهی با غذا استفاده کردند، که کاهش قابل توجهی در مرگ‌ومیر لاروهای دریافت‌کنندۀ پروبیوتیک مشاهده شد.

ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) یکی از ماهیان بومی و باارزش خلیج فارس است که در ایران تکثیر می‌شود. تلفات بالای دورۀ لاروی این ماهی یکی از موانع تکثیر آن است و ضروری است تحقیقاتی در این زمینه به‌ویژه با استفاده از فناوری‌های نوین آبزی‌پروری مانند کاربرد پروبیوتیک‌ها انجام پذیرد، تا بتوان رشد و بازماندگی این ماهی را بهبود بخشید. از این رو، در این تحقیق تأثیر دو باکتری BP6 *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* LP3، که قبلاً Ziaei-nejad (2010) از ماهی شانک جداسازی و خالص‌سازی کرده بود، در شاخص‌های رشد و بازماندگی و فلور میکروبی رودۀ لارو این ماهی با شیوه‌های رسانش مختلف ارزیابی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تیماردهی لارو ماهی شانک با باکتری‌های BP6 و LP3

این تحقیق در ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام انجام گرفت. باکتری‌های پروبیوتیکی BP6 و LP3 نخست با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی از ماهی شانک جداسازی شدند سپس، با تکنیک‌های ژنتیکی و با استفاده از توالی ژن 16s باکتری‌ها شناسایی شدند (Tannock, 1999). لاروهای ماهی شانک (سن ۲ هفته) به صورت طرح کاملاً تصادفی به مدت ۴۵ روز در معرض دو باکتری

1. Specific Growth Rate (SGR)

جداسازی‌شدهٔ BP6 و LP3 قرار گرفتند. برای هر باکتری سه تیمار با شیوه‌های رسانش مختلف در نظر گرفته شد. در تیمار اول باکتری‌های مورد نظر تنها از طریق آرتمیای غنی‌سازی‌شده در اختیار لاروها قرار گرفتند (تیمارهای BP6-A و LP3-A). در تیمار دوم باکتری‌های مورد نظر هر دو روز در میان با تراکم $۱۰^{۳}$ cells/ml به آب محیط پرورش لاروها افزوده شدند (تیمارهای BP6-w3 و LP3-w3) و در تیمار سوم باکتری‌های مورد نظر هر دو روز در میان با تراکم $۱۰^{۶}$ cells/ml به آب محیط پرورش لاروها اضافه شدند (تیمارهای BP6-w6 و LP3-w6). تیمار شاهد (C) نیز هیچ‌گونه باکتری، نه از طریق آب و نه از طریق آرتمیا، دریافت نکرد. غنی‌سازی آرتمیا با این دو باکتری بر اساس روش ارائه‌شدهٔ Ziaei-nejad (2010) با تراکم $۱۰^{۶}$ cells/ml انجام پذیرفت.

شرایط افزودن پروبیوتیک‌ها به صورت دو روز در میان به این خاطر است که تراکم باکتری در محیط خیلی بالا نرود (Riquelme *et al.*, 2000). محاسبهٔ مقادیر باکتریایی با مشخص‌کردن منحنی رشد هر باکتری و با ارتباط کشت آن‌ها با تراکم حاصل از جذب نوری آن‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر صورت می‌گرفت و تنظیم می‌شد (Ziaei-nejad, 2010).

واحدهای آزمایش شامل مخازن ۷۰ لیتری (با سه تکرار) بود. باکتری‌ها بعد از آماده‌سازی، با تراکم مورد نظر به آب محیط پرورش لاروها یا محیط غنی‌سازی آرتمیا اضافه می‌شدند. تراکم لارو ۱۵ قطعه در لیتر (۹۰۰ قطعه در هر مخزن) در نظر گرفته شد. دورهٔ شوری آب بین ۴۹–۴۷ ppt و دمای آب بین ۲۸–۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد متغیر بود. روزانه ۱۰–۵ درصد آب مخازن تعویض می‌شد. لاروها به طور روزانه با روتیفر *Brachionus plicatilis* (۲۰ عدد در میلی‌لیتر) و آرتمیا *A.franciscana* (۱۰–۵ ناپلی در میلی‌لیتر) تغذیه می‌شدند.

۲.۲. شاخص‌های مورد بررسی

۱.۲.۲. رشد و بازماندگی

در پایان دوره، شاخص‌های رشد و بازماندگی شامل وزن تر، طول کل، ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی با نمونه‌برداری ۵۰ قطعه لارو از هر مخزن سنجیده شد.

۲.۲.۲. سنجش باکتریایی

به منظور سنجش تعداد باکتری‌های کاندید و تعداد کل باکتری‌ها هر پنج روز یک بار نمونه‌برداری از آب مخازن (۱۰ میلی‌لیتر) و نیز لاروها (۲۰ لارو) انجام شد.

نمونه‌های لارو نخست، با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. سپس، برای ازبین‌بردن کامل باکتری‌های سطوح خارجی بدن با محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد شست‌وشو داده شدند (Gatesoupe, 1999). سپس، هم‌زمان با افزودن تدریجی ۹ برابر (w/v) محلول نمکی استریل (NaCl, 0.87% w/v) کاملاً هموژن شدند. نمونه‌های آب نیز به طور سریالی با محلول نمکی نرمال رقیق شدند.

تعداد کل باکتری‌ها روی محیط کشت Marine agar و تعداد باکتری‌های BP6 و LP3 به ترتیب روی محیط کشت‌های Bacillus cerius agar و MRS agar شمارش شد. پلت‌ها برای مدت ۷۲ ساعت در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بدین ترتیب تعداد باکتری‌ها بر حسب CFU/ml (در نمونهٔ آب) یا CFU/larvae (در نمونهٔ لاروی) سنجیده شد. میانگین تعداد باکتری‌ها برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

۳.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال‌بودن داده‌های بازماندگی با استفاده از آزمون Anderson-Darling (نرم‌افزار MINITAB 13.31) بررسی و با تابع ArcSin نرمال شدند. میانگین همهٔ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون دانکن در سطح ۵ درصد با هم مقایسه شد.

۳. نتایج

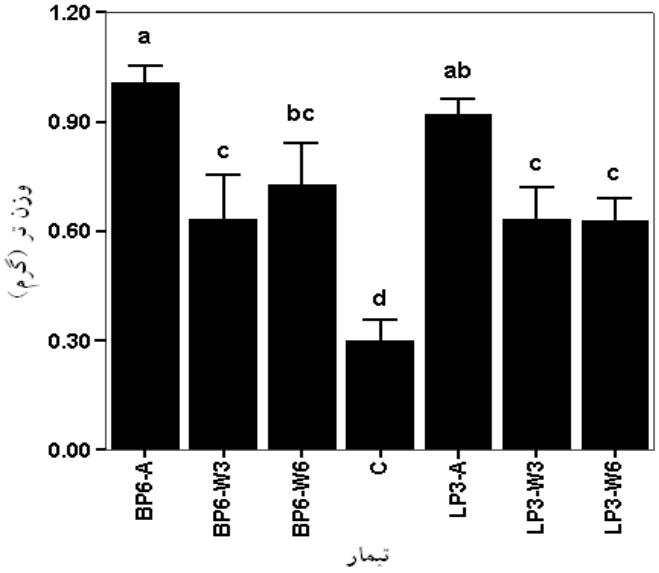
۱.۳. رشد و بازماندگی

نتایج نشان داد که هر دو باکتری BP6 و LP3 در همهٔ تیمارها توانستند شاخص‌های رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک *A. latus* را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری بهبود بخشند (p<۰/۰۵). از لحاظ وزن تر بیشترین وزن در تیمارهای BP6-A و LP3-A مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای باکتریایی داشتند (p<۰/۰۵) (نمودار ۱).

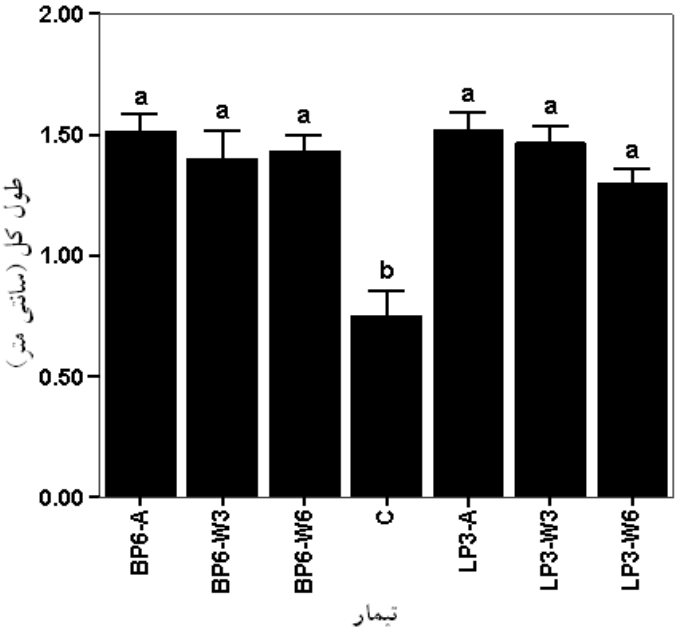
تیماردهی لاروهای ماهی شانک با این باکتری‌ها به طور معنی‌داری طول کل لاروها را نسبت به تیمار شاهد (۰/۱۰±۰/۷۵ سانتی‌متر) افزایش داد (p<۰/۰۵) (نمودار ۲).

ضریب رشد ویژه نیز در تیمارهای باکتریایی نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) و کمترین ضریب رشد ویژه در تیمار شاهد مشاهده شد (نمودار ۳).

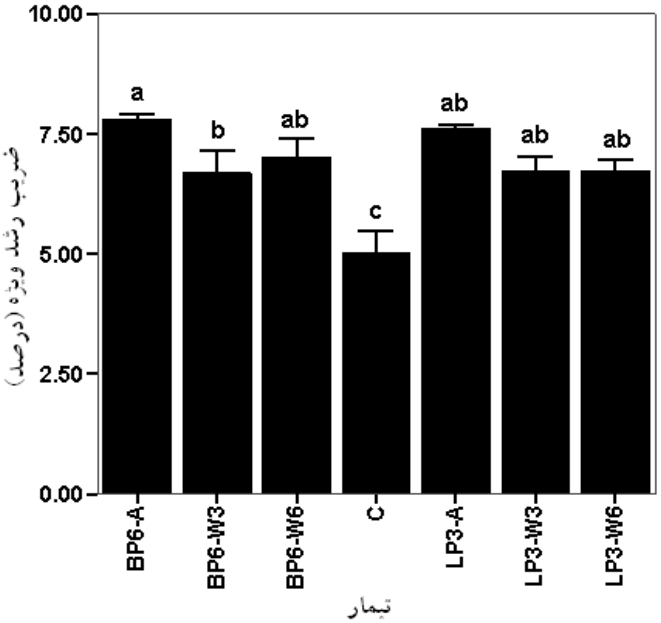
تحت تأثیر هر دو باکتری BP6 و LP3 بازماندگی در مقایسه با تیمار شاهد به میزان ۲۰-۱۰ درصد افزایش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار ۴). تیمار BP6-W6 با بازماندگی ۳/۱۷±۷۳/۶۶ درصد بیشترین بازماندگی را نشان داد.



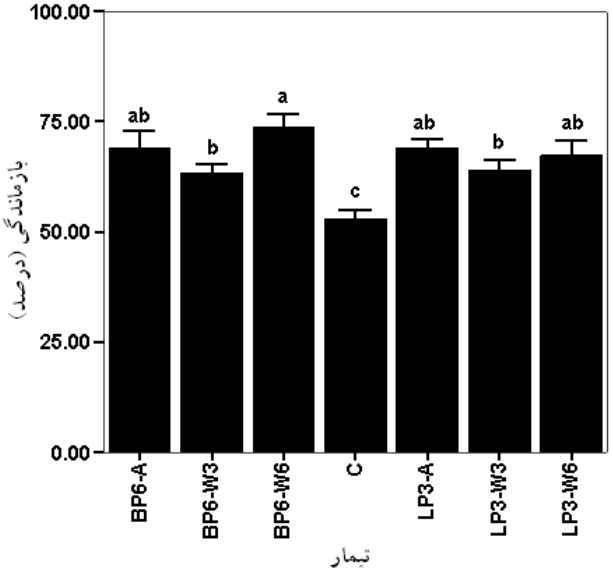
نمودار ۱. وزن تر لارو ماهی شانک (خطای استاندارد ± میانگین) در تیمارهای مختلف در پایان آزمایش. تیمارهایی که دارای حروف بالاچین متفاوتی‌اند اختلاف معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵).



نمودار ۲. طول کل لارو ماهی شانک (خطای استاندارد ± میانگین) در تیمارهای مختلف در پایان آزمایش. تیمارهایی که دارای حروف بالاچین متفاوتی‌اند اختلاف معنی‌داری دارند (ρ<۰/۰۵).



نمودار ۳. ضریب رشد ویژه لارو ماهی شانک (خطای استاندارد ± میانگین) در تیمارهای مختلف در پایان آزمایش. تیمارهایی که دارای حروف بالاچین متفاوتی‌اند اختلاف معنی‌داری دارند (ρ<۰/۰۵).



نمودار ۴. درصد بازماندگی لارو ماهی شانک (خطای استاندارد ± میانگین) در تیمارهای مختلف در پایان آزمایش. تیمارهایی که دارای حروف بالاچین متفاوتی‌اند اختلاف معنی‌داری دارند (ρ<۰/۰۵).

۲.۳. سنجش باکتری‌ها

نتایج آزمایش‌های باکتریایی نشان داد که هر دو باکتری BP6 و LP3 توانستند در همهٔ تیمارها استقرار قابل قبولی هم در آب و هم در دستگاه گوارش داشته باشند. بیشترین تعداد باکتری‌های مورد نظر در آب مربوط به تیمارهایی بود که بیشترین باکتری را از طریق آب دریافت کردند (تیمارهای BP6-W6 و LP3-W6) (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین تعداد باکتری‌های کاندید و نیز تعداد کل باکتری‌ها در آب محیط پرورش لاروها (CFU/ml) و نیز در دستگاه گوارش لارو ماهی شانک (CFU/larvae) طی دورهٔ پرورش

		آب			دستگاه گوارش		
		تعداد باکتری کاندید	تعداد کل باکتری‌ها	درصد باکتری کاندید	تعداد باکتری کاندید	تعداد کل باکتری‌ها	درصد باکتری کاندید
تیمار	LP3-A	$۶/۰\times۱۰^{۲a}$	$۱/۳\times۱۰^{۴a}$	۴/۶۵	$۳/۹\times۱۰^{۳b}$	$۱/۸\times۱۰^{۴a}$	۲۱/۷۷
	LP3-W3	$۷/۲\times۱۰^{۲a}$	$۱/۴\times۱۰^{۴a}$	۵/۱۱	$۳/۶\times۱۰^{۲a}$	$۱/۰\times۱۰^{۴a}$	۳/۶۷
	LP3-W6	$۱/۲\times۱۰^{۵b}$	$۸/۵\times۱۰^{۵ab}$	۱۴/۵۴	$۵/۳\times۱۰^{۲a}$	$۱/۲\times۱۰^{۴a}$	۴/۴۳
	BP6-A	$۱/۰\times۱۰^{۳ab}$	$۱/۱\times۱۰^{۴a}$	۹/۲۱	$۳/۷\times۱۰^{۳b}$	$۲/۰\times۱۰^{۴a}$	۱۸/۵۲
	BP6-W3	$۱/۸\times۱۰^{۳ab}$	$۱/۷\times۱۰^{۴a}$	۱۰/۶۸	$۴/۳\times۱۰^{۲a}$	$۹/۶\times۱۰^{۳a}$	۴/۵۶
	BP6-W6	$۲/۲\times۱۰^{۵b}$	$۹/۰\times۱۰^{۵ab}$	۲۵/۲۵	$۶/۲\times۱۰^{۲a}$	$۱/۱\times۱۰^{۴a}$	۵/۶۵
	C	----	$۹/۸\times۱۰^{۵ab}$	----	----	$۷/۹\times۱۰^{۴ab}$	----

* حروف انگلیسی متفاوت در بالای اعداد در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

در تیمارهای BP6-W3 و LP3-W3، به طور متوسط به ترتیب $۱/۸\times۱۰^{۳}$CFU/ml و $۷/۲\times۱۰^{۲}$ باکتری کاندید در آب محیط پرورش لارو ماهی شانک در کل دوره شمارش شد (جدول ۱). با این‌که در دو تیمار BP6-A و LP3-A باکتری‌های کاندید فقط از طریق آرتمیا در اختیار لاروها قرار گرفتند، در این تیمارها نیز به ترتیب ۹/۲۱ و ۴/۶۵ درصد از کل باکتری‌های آب را باکتری‌های کاندید تشکیل دادند.

برخلاف آنچه در آب اتفاق افتاده بود، بیشترین تعداد باکتری کاندید در تیمارهای BP6-A و LP3-A به ترتیب به میزان CFU/larvae $۲/۰\times۱۰^{۴}$ و $۱/۸\times۱۰^{۴}$ شمارش شد (جدول ۱).

۴. بحث

همان گونه که قبلاً اشاره شد، نتایج تحقیق بیان‌گر توانایی استقرار هر دو باکتری BP6 و LP3 در آب محیط پرورش و در دستگاه گوارش لاروهاست. در این تحقیق از دو مقدار cells/ml $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۶}$ برای افزودن باکتری‌ها به آب استفاده شد، که تقریباً مشابه مقداری است که Riquelme *et al.* (2000) پیشنهاد و استفاده کردند. این محققان بین $۱۰^{۴}$ تا cells/ml $۱۰^{۶}$ از سویهٔ پروبیوتیکی *Archrobacter* sp. را در آب پرورش لارو اسکالوپ (*Argopecten purpuratus*) استفاده کردند. تحقیقات نشان داده است که حتی استفاده از غلظت‌های پایین‌تر باکتری (cells/ml $۱۰^{۳}$)، اما با فواصل استفاده هر چند روز یک بار می‌تواند استقرار باکتری‌های پروبیوتیکی در دستگاه گوارش لارو اسکالوپ را تضمین کند (Riquelme *et al.*, 2000). به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای cells/ml $۱۰^{۷}$ فقط اسرافی در هزینه‌هاست. Gomez-Gil *et al.* (2000) نیز دریافتند که در سیستم‌های آبزی‌پروری تراکم باکتری‌های افزوده‌شده به‌ندرت به این میزان می‌رسد.

همان گونه که نتایج تحقیق حاضر نشان داد، تعداد کل باکتری‌ها هم در آب و هم در دستگاه گوارش لارو ماهی شانک در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای باکتریایی بود ($۹/۸\times۱۰^{۵}$ و $۷/۹\times۱۰^{۴}$ به ترتیب در آب و دستگاه گوارش تیمار شاهد) (جدول ۱). این امر ممکن است به این دلیل باشد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی از رشد سایر باکتری‌ها جلوگیری کنند. در تحقیق دیگری دربارهٔ استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی در لارو ماهی کاد (*Gadus morhua*) نیز نتایج مشابهی به دست آمده است (Strom and Ringo, 1993)، البته شایان ذکر است که رابطه‌ای بین تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش و بازماندگی لاروها وجود ندارد (Huys *et al.*, 2001) و به نظر می‌رسد ترکیب میکروفلور دستگاه گوارش لاروها تأثیر بسزایی در بازماندگی آن‌ها دارد.

چنان که از نتایج این آزمایش برمی‌آید، باکتری‌های کاندید توانسته‌اند با درصد قابل قبولی به‌خوبی فلور غالب باکتریایی محیط (آب) و لولهٔ گوارش لاروها را تشکیل دهند که این امر در تیمارهای BP6-W6 و LP3-W6 (در آب) و BP6-A و LP3-A (در دستگاه گوارش) با درصد مناسبی کاملاً مشهود است (جدول ۱). در واقع شرط لازم برای این‌که پروبیوتیکی بتواند تأثیرات خود را اعمال کند، همین استقرار در محیط یا دستگاه گوارش است. آنچه می‌تواند به استقرار پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش آبزیان کمک شایانی کند زمان استفاده از آن‌ها

با توجه به مرحلهٔ رشد آبزی هدف است و مسلماً افزودن پروبیوتیک‌ها در دوران لاروی و به‌ویژه بلافاصله پس از تخم‌گشایی به منظور اشغال و کلونی‌سازی لولهٔ گوارش بسیار حائز اهمیت است. Fuller (1992) ذکر کرده است که این اصل کلی همواره حاکم است که تأثیرگذاری در فلور دستگاه گوارش طی مرحلهٔ لاروی در مقایسه با مراحل بعدی زندگی آسان‌تر است. به این دلیل که پس از عبور از مرحلهٔ لاروی فلور نسبتاً ثابتی در لولهٔ گوارش ایجاد می‌شود. بنابراین، می‌توان توصیه کرد که مصرف پروبیوتیک‌ها باید تا حد ممکن در دورهٔ لاروی و مدت کوتاهی پس از تخم‌گشایی و شروع تغذیه آغاز شود. Ringo و Vadstein (1998) نیز، با اشاره به اهمیت تجویز پروبیوتیک‌ها در زمان تغذیهٔ اولیه، بیان کردند که بلعیده‌شدن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی به‌ویژه پس از تغذیهٔ اولیه باعث استقرار یک فلور میکروبی اولیه در رودهٔ آن‌ها می‌شود. بنابراین، با مصرف پروبیوتیک‌ها در مرحلهٔ لاروی، آن‌ها می‌توانند بخش قابل توجهی از فلور میکروبی ثابت دوران بلوغ را به خود اختصاص دهند.

از سوی دیگر، زمان تخلیهٔ دستگاه گوارش یا زمان عبور مواد غذایی از دستگاه گوارش نقش تعیین‌کننده‌ای در استقرار پروبیوتیک‌ها دارد. مسلماً اگر نرخ رشد پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش و اتصال آن‌ها به دیوارهٔ این دستگاه کمتر از نرخ تخلیهٔ دستگاه گوارش آبزی هدف باشد، کارایی استقرار در دستگاه گوارش کاهش می‌یابد و نیاز به استفادهٔ مکرر با تراکم بیشتر از پروبیوتیک‌ها به وجود می‌آید که خود باعث اتلاف هزینه می‌شود.

لارو ماهیان دریایی به منظور تنظیم اسمزی همواره مقداری آب اطراف خود را می‌نوشند و از این طریق باکتری‌های محیط اطراف را جذب می‌کنند (Olafsen, 2001). به همین دلیل در تیمارهایی که باکتری‌های کاندید فقط از طریق آب در اختیار لاروها قرار داده شد نیز مقدار قابل توجهی باکتری کاندید در دستگاه گوارش لاروها مشاهده شد (جدول ۱). هر چند تعداد این باکتری‌ها در دستگاه گوارش لارو تیمارهای BP6-A و LP3-A، که از طریق آرتمیا باکتری‌ها را دریافت کردند، نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود که این امر به دلیل تغذیهٔ مستقیم لاروها با باکتری‌های تجمع‌یافته درون آرتمیاست.

نتایج نشان داد که باکتری‌های کاندید BP6 و LP3 که به ترتیب از جنس باسیلوس و لاکتوباسیلوس‌اند توانستند به طور معنی‌داری در تیمارهای مختلف همهٔ شاخص‌های رشد و بازماندگی را بهبود بخشند ($p<۰/۰۵$). در تحقیقات متعددی تحت تأثیر این دو گروه از باکتری‌ها، افزایش رشد و بازماندگی هم در سخت‌پوستان (Dalmin *et al.*, 2001; Ziaei-nejad *et al.*, 2006; Wang, 2007) و هم در ماهیان (Carnevali *et al.*, 2006; Suzer *et al.*, 2008; Faramarzi *et al.*, 2011) مشاهده شده است.

افزایش بازماندگی لارو ماهی شانک تحت تیمار این باکتری‌ها (BP6 و LP3) ممکن است دلایل مختلفی داشته باشد. همان گونه که Moriarty (1998) نیز بیان کرده است باکتری‌های باسیلوس هم قادرند سایر باکتری‌ها را از بین ببرند و هم قادرند برای مواد غذایی، فضا و سطح با سایر باکتری‌ها رقابت کنند. همچنین، نشان داده شده است که پروبیوتیک *Bacillus* Sll قادر است هم در محیط و هم در دستگاه گوارش میگو جایگزین گونه‌های

ویبریو شود و از این طریق بازماندگی را افزایش دهد (Rengpipat *et al.*, 2000). بـه عـلاوه، افـزایش بازماندگی ممکن است به علت افزایش سـطح ایمنـی در لاروهای ماهی شانک و مقاومت در مقابل عوامـل بیماری‌زا نیز باشد. همـان گونـه کـه Balcazar *et al.* (2008) افـزایش سـطح ایمنـی مـاهی قـزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از باکتری‌های *Lactobacillus* sp. و Nayak *et al.* (2007) بهبـود شـاخص‌هـای ایمنـی مـاهی *Labeo rohita* بـا اسـتفاده از بـاکتری *B.subtilis* را نشـان دادنـد. بیـان شـده اسـت کـه پروبیوتیک *Bacillus* Sll می‌تواند با فعال‌سازی دفـاع ایمنی هومورال و سـلولی و نیـز بـا مکانیسـم حـذف رقابتی در دستگاه گوارش، از آن‌ها در برابر بیماری‌ها محافظت کنـد (Rengpipat *et al.*, 2000). همچنـین، پپیتیدوگلیکان‌های دیـوارهٔ سـلولی باسـیلوس ممکـن است باعـث عملکـرد دفـاعی شـوند (Itami *et al.*, 1999).

افـزایش شـاخص‌هـای رشـد و نیـز بهبـود شاخص‌های تغذیه‌ای تحـت تـأثیر پروبیوتیـک‌هـا در مطالعات مختلفی در آبزیان بـه اثبـات رسـیده اسـت (Ziaei-nejad *et al.*, 2006; Faramarzi *et al.*, 2010; Alizadeh *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2013).

از نظر شاخص‌های رشـد نیـز افـزایش‌هـایی در تیمارهای باکتریایی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد یکی از علل این افزایش رشد افزایش احتمالی فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های گـوارش در محوطـهٔ لولهٔ گوارش لاروهاسـت کـه باعـث هضـم و جـذب بهتر غذا و افزایش کارایی تغذیه‌ای لاروها شده است. شایان ذکر است که این باکتری‌هـا (BP6 و LP3) در آزمایش‌های قبلی فعالیت آنزیمی قابل توجهی از خود نشـان دادنـد (Ziaei-nejad, 2010). در تیمارهـای BP6-A و LP3-A احتمـالاً بـه علـت ایـن‌کـه لولـهٔ گوارش لاروها از طریـق آرتمیـای غنـی‌سـازی‌شـده مستقیماً به وسیلهٔ باکتری‌ها مورد هدف قـرار گرفـت، تعداد بیشتری باکتری کاندید در لولـهٔ گـوارش آن‌هـا شناسایی شد و عوامل رشد نیز در این دو تیمار بیشتر از سایر تیمارها بود. این موضوع را احتمالاً مـی‌تـوان به تولید بیشتر آنزیم‌های گوارشی در این تیمارهـا بـا وجود باکتری‌های کاندید بیشتر مربوط دانست. همان گونـه کـه Ziaei-nejad *et al.* (2006) نیـز رابطـهٔ مستقیم بین وجـود پروبیوتیـک در دسـتگاه گـوارش میگو (*F.indicus*) و تولید آنزیم‌های گوارشی بیشـتر و در نتیجه رشد بهتر را به اثبات رساندند.

از سوی دیگر، Carnevali *et al.* (2006) افزایش رشـد در مـاهی بـاس دریـایی (*Dicentrarchus labrax*) بـه دنبـال اسـتفاده از پروبیوتیـک *Lactobacillus delbrueckii* را بـا افـزایش بیـان ژن IGF1 که منتج بـه رشـد عضـلانی بیشـتر مـی‌شـود، همچنین با کاهش هورمـون کـورتیزول کـه بـه طـور مستقیم در پاسخ‌های استرس‌زا دخیل است در رابطـه دانسته‌اند.

همان گونه که تحقیقات گذشته نشان داده اسـت دو سویهٔ BP6 و LP3 توانستند آزمون‌هـای مختلـف In vitro را بـا موفقیـت پشـت سـر گذارنـد (Ziaei-nejad, 2010) و در نهایـت توانـایی آن‌هـا روی لارو ماهی شانک به صورت بهبود شـاخص‌هـای رشـد و بازماندگی به اثبات رسید. بر همین اساس، با توجه به مراحل غربالگری و معیارهای سنجش پروبیوتیک‌هـا، مـی‌تـوان ایـن دو گونـه (BP6 و LP3) را بـه‌منزلـهٔ

سویه‌های پروبیوتیکی برای ماهی شانک و شاید با مطالعات تکمیلی برای سایر ماهیان دریایی معرفی کرد. از آن‌جایی که هر دو باکتری تقریباً به یک میزان باعث بهبود شرایط رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک شدند، هر دو پتانسیل خوبی برای پروبیوتیک‌شدن دارند.

References

[1]. Alizadeh M., Farzanfar A., Nafisi-Bahabadi M., 2011The effect of probiotic Bioplus 2B on growth performance and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) larvae ., Indian J. Fish., 58(4) : 55-59

[2]. Avella MA, Olivotto I, Silvi S, Place AR, Carnevali O., 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010 Feb; 298(2):R359-71.

[3]. Balcázar, J.L., Vendrell, D., Blas, I.d., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L., Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish., Aquaculture, 278, 188-191.

[4]. Carnevali, O.; Zamponi, M. C.; Sulpizi, R.; Rollo, A.; Nardi, M.; Orpianesi, C.; Silvi, S.; Caggiano, M.; Polzonetti, A. M.; Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aquaculture International, v. 12, n. 4-5, p. 377-386,

[5]. Carnevali, O., Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, L., Silvi S., and 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.

[6]. Dalmin, G., Kathiresan K., and Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem, Indian J. Exp. Biol. 39, 939–942.

[7]. Faramarzi M., Jafaryan H., Patimar R., Iranshahi F., Lashkar Boloki M., Farahi A., Kiaalvandi S., Ghamsary M., Makhtoumi and N.M., 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 (2): 145-150

[8]. Fuller, R., 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R.(Ed.) , Probiotics: the Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, pp. 1–8.

[9]. Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147-165.

[10]. Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringo, E., 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia 352, 279–285.

[11]. Gomez-Gil, B., Roque, A. and Velasco-Blanco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture 211, 43-48.

[12]. Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollevier, F., Sorgeloos, P., Swings J., 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture Aquaculture, 193, 25-37.

[13]. 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.

[14]. Kennedy, S.B., Tucker, J.W., Thoresen, M., Sennett, D.G., 1998. Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae. Aquaculture 98. World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 286.

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

[16]. Mohamed A.H., Traifalgar R.F.M., Serrano A.E., 2013 Assessment of Probiotic Application on Natural Food, Water Quality and Growth Performance of Saline Tilapia *Oreochromis mossambicus* L. Cultured in Concrete Tanks, Fisheries and Aquaculture Journal, Vol. 2013: FAJ-75

[17]. Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164,351–358.

[18]. Nayak, S.K., Swain, P., Mukherjee, S.C., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) Fish & Shellfish Immunology, 23, 892-896.

[19]. Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture, 200, 223-247.

[20]. 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.

[21]. Ringo E., Vadstein, O., 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot, *Scophtalmus maximus*(L.) larvae. J. Appl. Microbiol. 84, 227–233.

[22]. Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. Aquaculture 181, 25–36.

[23]. Strøm, E. and Ringø, E. 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In Physiology and Biochemical Aspects of Fish Development. Walther,B.T. and Fyhn,H.J. (eds.). University of Bergen, Bergen, Norway p. 226-228.

[24]. Suzer, C., Coban, D., Kamaci, O.H., Saka, S., Firat, K., Otgucuoglu Ö., and Kücüksari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280, 140–145.

[25]. Tannock, G. W. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Current Issues Molec. Biol. 1(1): 53-64.

[26]. Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*, Aquaculture 269, 259–264.

[27]. Ziaei-Nejad, S., Habibi-Rezaei, M., Azari-Takami G., Lovett, DL., Mirvaghefi, A. & 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.

[28]. Ziaei-Nejad, S., 2010. Screening of probiotic bacteria from yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) gastrointestinal tract and investigating their effects on growth and survival indices of the fish. PhD thesis. Tehran University