فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ٤، شمارهٔ ٤، زمستان ١٣٩٤، صفحه ١- ١٧

اثر سه گونه باکتری پروبیوتیکی بر رشد و بقای ناپلی آرتمیا، *Artemia fransiscana*، در مواجهه با باکتری بیماری‌زای *Vibrio campbellii*

نصراله احمدی فرد[1]*، امیر توکمه چی[2]، مسعود مهرابی [3]

١- استادیار، گروه شیلات وآبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران
٢- استادیار، گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ایران
٣- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران

دریافت : ١٣٩٤/٠٤/٠٦ پذیرش : ١٣٩٤/٩/١٧

*نویسنده مسئول مقاله: N.ahmadifard@urmia.ac.ir

چکیده:

تأثیر٣ نوع پروبیوتیک (*Lactobacillus plantarum*، *L.casei* و *Bacillus subtilis*) بر رشد و بقای ناپلی آرتمیا، *A. fransiscana*، در مواجهه با باکتری بیماری‌زای *Vibrio campbellii* در شرایط نوتوبیوتیک بررسی شد. تعداد ١٥٦٠ عدد ناپلیوس به‌طورمساویبه ٧٨ لوله فالکون حاوی ٣٠ میلی‌لیتر آب اتوکلاو شده با شوری ppt ٧٠ منتقل شدند. تیمارها شامل یک شاهد (جلبک دونالیلا) و ١٢ تیمار از ٣ باکتری پروبیوتیکی (هرکدام با جایگزینی‌های ٢٥٪، ٥٠٪، ٧٥٪، ١٠٠٪) با ٦ تکرار بود. در روز ششم میزان بقا، طول ناپلی‌ها و شمارش پرگنه باکتری‌های موجود در بدن ناپلی‌ها بررسی شدند. مواجهه با باکتری *V. campbellii* در روز ششم انجام شد. بیشترین طول ناپلی در تیمار ٢٥٪ باکتری *L. plantarum* و ٧٥٪ جلبک دونالیلا مشاهده گردید($p<0/05$). بیشترین میزان بقا در ناپلی پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت مواجهه با باکتری *V. campbellii* در تیمار ١٠٠٪ باکتری *L. plantarum* و کمترین درصد بقا در تیمار ١٠٠٪ جلبک دونالیلا مشاهده شد. نتایج حاصل از شمارش پرگنه باکتری‌ها در روز ششم اختلاف معناداری بین تیمارها نشان داد($p<0/05$). بیشترین تعداد پرگنه در تیمارهای ١٠٠٪ باکتری *B. subtilis* و *L. casei* بود. کمترین تعداد پرگنه باکتری‌ها در تیمارهای ٢٥٪ باکتری *L. plantarum* و *L. casei* ٧٥٪ جلبک دونالیلا مشاهده شد. نتایج نشان داد که استفاده از باکتری *L. plantarum* با جایگزینی ٢٥٪ با جلبک دونالیلا عملکرد بهتری نسبت به باکتری‌های *L. casei* و *B. subtilis* دارد.

کلیدواژگان: پروبیوتیک، *Artemia fransiscana*، باکتری بیماری‌زا، گنتوبیوتیک

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

مقدمه

غذاهای زنده از جمله آرتمیا نقش مهمی در رژیم غذایی لارو ماهیان و سخت پوستان ایفا می‌کنند (Sorgeloos et al., 1986). به هر حال این غذاها می‌توانند به‌عنوان منابع انتقال دهنده بیماری به محیط تفریخگاهی لارو ماهیان و سخت‌پوستان باشند (Vaseeharan and Ramasamy, 2003).از طرف دیگر جلوگیری از انتقال و گسترش بیماری از طریق ارگانیسم‌های غذایی از ضروریات آبزی‌پروری است. به همین منظور چندین روش جلوگیری کننده وجود دارد که عملیات‌های معمول مانند ضدعفونی و همچنین استفاده از مواد شیمیایی وآنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آنها می‌باشند(Vadstein, 1997). با این وجود چنین عملیات‌هایی از زمانی‌که رواج استفاده از آنها باعث مقاومت باکتریایی در موجودات و محیط مورد نظر شده است، زیاد مورد قبول واقع نشده(Cavalier-Smith, 2003)و حتی در بسیاری از کشورها استفاده از آنها ممنوع شده است (Isolauri et al 2001). به همین دلیل امروزه استفاده از محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت بیشتری دارد.

کاربرد پروبیوتیک‌ها باید براساس آگاهی از مکانیسم-های عمل آنها باشد. بخش مهم از آگاهی این مکانیسم‌ها جستجو در مورد جزئیات عملکرد متقابل میزبان – میکروب است. یک روش کلیدی برای مطالعه این عملکرد متقابل این است که در ابتدا از نحوهٔ عملکرد میزبان در عدم حضور میکروب آگاه شده و سپس با افزودن یک یا چند میکروب واکنش و عملکرد آنها بررسی شود (تحت شرایط گنتوبیوتیک) (Gordon and Pesti, 1971). آرتمیا موجودی مناسب برای بررسی عملکرد متقابل میزبان– میکروب است و همچنین می‌توان آرتمیا را به‌راحتی تحت شرایط گنتوبیوتیک کشت داد (Marques et al., 2004).

علاوه بر آن آرتمیا را می‌توان تحت شرایط گنتوبیوتیکی مختلف با انواع باکتری‌های پروبیوتیکی غنی‌سازی کرد(Verschuere et al., 1999).

از طرف دیگرمکانیسم دفاعی برای مقابله با بیماری‌های عفونی در بی‌مهرگانی از قبیل آرتمیابرخلاف مهره‌داران عمدتاً به پاسخ‌های ایمنی بستگی دارد و غیراختصاصی است(Kurtz and Franz, 2003). محرک‌های ایمنی می-توانند برای کاهش استرس، مرگ‌ومیر و حفظ سلامتی موجودات مورد پرورش به‌کار روند (Raa, 2000). پروبیوتیک‌ها با تقویت سیستم ایمنی می‌توانند‌در کاهش آسیب‌پذیری بی‌مهرگان در مقابل عفونت یا بیماری به‌کار رفته در آزمایش‌های تحت شرایط پرورش کنترل شده مفید باشند(Marques et al., 2006) همچنین باکتری‌های پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زای ویبریو در محیط کشت آرتمیا می‌شوند.(Verschuere et al., 2000).در دنیااز پروبیوتیک‌ها در شرایطغیرگنتوبیوتیک (Haq et al., 2012; Villamil et al 2003) و گنتوبیوتیک (Marques et al., 2004, 2005, 2006a,b)برای بررسی رشد و کنترل باکتری بیماری‌زا آرتمیا استفاده شده است،اما در داخل کشور تنها در شرایط غیرگنتوبیوتیک مطالعات محدودی همچون استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی(جبارپور ١٣٩٣)وباکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis*(احمدنیای مطلق و همکاران ١٣٩١) در بررسی شاخص‌های رشد و فلور میکروبی آرتمیا استفاده شده و در شرایط گنتوبیوتیک برای بررسی تأثیر پروبیوتیک در مواجهه با باکتری بیماری‌زا مطالعاتی صورت نگرفته است. از این‌رو در این تحقیق از ٣ باکتری پروبیوتیکی (*Lactobacillus plantarum*،*Lactobacillus casei* و *Bacillus subtilis*) با درصدهای مختلف جایگزینی با

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

جلبک برای بررسی رشد، میزان بقا و مقاومت آرتمیا در مواجهه با باکتری بیماری‌زای *Vibrio campbellii* استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

شرایط عمومی کشت *Artemiafransiscana*

سیست‌های مورد استفاده ابتدا طبق روش (Sorgeloos, 1986) کپسول‌زدایی شدند. سپس، سیست‌ها کاملاً با آب شیرین اتوکلاو شده در زیر هود لامینار شسته شدند تا جایی‌که بوی کلر از بین رفت. پس از آن، سیست‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۰/۱ نرمال HClقرار داده شدند و با آب شیرین اتوکلاو شده به‌خوبی شسته و در زیر هود لامینار به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتر استریل که محتوای ۳۵ میلی‌لیتر آب ۳۰ قسمت در هزار بود، اضافه گردید. سپس لوله فالکون‌ها را روی دستگاه روتاتور با سرعت ٤ دور در دقیقه قرار داده و دمای اتاق روی ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. پس از ۱۸ تا ۲۰ ساعت سیست‌ها تخم‌گشایی شدند (Sorgeloos, 1986).

شرایط پرورش در لوله‌های فالکون و راه‌اندازی شرایط گنتوبیوتیک

ناپلیوس‌های هچ شده براساس ویژگی نورگرایی، در قسمت ته لوله‌های فالکون متراکم و با پیپت پاستور استریل ناپلیوس‌ها به پتری دیش استریل منتقل شدند(همراه با مقداری آب). سپس، تعداد ۳۰ عدد ناپلیوس به هر یک از لوله فالکون‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب ۷۰ قسمت در هزار استریل، منتقل شدند. برای حفظ شرایط استریل (گنوتوبیوتیک) تمامی عملیات آزمایش زیر هود لامینار انجام شد. لوله فالکون‌ها روی روتاتور با سرعت ٤ دور در دقیقه در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند(Soltanian et al., 2007).

سویه‌های باکتری‌هامورد استفاده و نحوهٔ کشت آنها

سه سویه باکتری *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus casei* و *Bacillus subtilis*به‌عنوان باکتری پروبیوتیکی و باکتری*Vibrio campbellii*به‌عنوان باکتری بیماری‌زا برای انجام آزمایش مواجهه استفاده شد. این باکتری‌ها از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه گردید. برای کشت باکتری *Bacillussubtilis*وباکتری بیماری‌زای *Vibrio campbellii*از محیطکشت (TSB) Tryptic Soy Broth و برای باکتری‌های*Lactobacillusplantarum*و *Lactobacillus casei*از محیط کشتMRS Broth که محصول شرکت مرکآلمان بود، استفاده شد.

برای حفظ شرایط گنتوبیوتیک کشت سویه‌های باکتری در زیر هود لامینار به‌صورت زیر کشت شدند:

ابتدا محیط‌های کشت آماده شده در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری در داخل اتوکلاو در شرایط استاندارد استریل شدند. پس از سرد شدن این محیط‌ها باکتری مورد نظر به آن معرفی و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تکان‌دهنده[1] قرار داده شد تا باکتری‌ها رشد کنند(Soltanian et al., 2007).

تهیه و کشت جلبک *Dunaliellatertiolecta*

استوک اولیه و خالص جلبک آب شور*Dunaliellatertiolecta*از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه[2]تهیه شد. این جلبک برای اولین بار از کشور بلژیک وارد شده و سویه خالصیبود.برای کشت جلبک مورد نظر از شدت نور حدود ۲۰۰۰ لوکس و دمای اتاق (درحدود ۲

1. Shaker incubator

۲.پژوهشکده آرتمیا و آبزیان سابق

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

±۲۸ درجه سانتی‌گراد) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا به میزان لازم از آب دریاچه فیلتر و سپس با دستگاه اتوکلاو استریل شد و پس از خنک شدن آن با استفاده از آب مقطر به شوری مناسب کشت این نوع جلبک که ۷۰ گرم بر لیتر بود، رسانده شد. از محیط کشت والنه برای کشت جلبک استفاده شد. جلبک کشت شده با کمک سانتریفوژ تغلیظ شد. برای تعیین تراکم جلبک غلیظ شده محلول همگن گردید و سپس یک میلی‌لیتر از آنرا برداشته و با استفاده از لام نئوبار تراکم جلبکی تخمین زده شد(Sorgeloos, 1986). برای حفظ شرایط گنتوبیوتیک تمام دستکاری‌های جلبک در زیر هود لامینار با وسایل استریل شده انجام شد.

وزن سنجی جلبک دونالیلا*Dunaliellatertiolecta*

تعداد سلول‌های جلبک دونالیلا پس از انجام سانتریفیوژ و شمارش با لام نئوبار برابر با $۲۱/۱۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس مقدار ۵۰ سی‌سی از آن، ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شد و برای وزن سنجی بر روی کاغذ صافی ۰/٤۵ میکرون که از قبلبا آون خشک و با ترازوی میکروگرمی توزین شده بود، ریخته شد. برای خشک شدن جلبک ریخته شده بر روی صافی از آون با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت استفاده شد. سپس کاغذ صافی به همراه جلبک خشک شده مجدد توزین گردید و داده‌های آن ثبت شد. این عمل ۳ بار تکرار و میانگین آنها به‌عنوان وزن نهایی استفاده شد(Soltanian et al., 2007).

سنجش و تنظیم تعداد باکتری‌ها

پس از کشت باکتری‌ها برای تعیین تراکم و وزن معادل آن محیط کشت داخل هر ارلن به‌صورت جداگانه با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. قسمت رویی سانتریفیوژ شده دور ریخته شد و به قسمت زیرین (باکتری‌های ته‌نشین شده) نیز برای شستشو و جداسازی محیط کشت از باکتری‌هاسرم فیزیولوژی اضافه گردید و به‌خوبی بهم زده شد و مجدد سانتریفیوژ گردید. پس از ۲ بار شستشو با افزودن سرم فیزیولوژی به توده باکتری‌های ته‌نشین شده و بهم زدن، محیط یکنواختی به‌دست آمد.برای سنجش و تنظیم تراکم باکتری‌ها از اسپکتروفتومتر دیجیتالی استفاده گردید (Toi et al., 2014).

برای تعیین تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر، مقدار یک سی‌سی از هر فالکن به‌وسیله سمپلر برداشت شد و در ۳ لوله آزمایش به‌طور جداگانه ریخته شد. ابتدا اسپکتروفتومتر با سرم فیزیولوژی کالیبره گردید و سپس هریک از نمونه‌های باکتری در ۳ تکراربه‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. عدد به‌دست آمده در فرمول زیر قرار گرفت که در فرمول زیرDf میزان رقیق‌سازی و OD عدد خوانده شده توسط اسپکتروفتومتر است (Toi et al., 2014).

$$\text{مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر} = Df \times 12 \times OD \times 10^{8}$$

سپس برای وزن سنجی ۵۰ سی‌سی از هر کدام از باکتری‌ها سانتریفوژ و بر روی کاغذ صافی ۰/٤۵ میکرون که از قبلبا آون خشک و با ترازوی میکروگرمی توزین شده بود، ریخته شد. برای خشک شدن نمونه‌های ریخته شده بر روی صافی از آون با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت استفاده شد. سپس کاغذ صافی به همراه نمونه خشک شده مجدد توزین گردید و داده‌های آن ثبت شد. نتایج سنجش تعداد و وزن باکتری‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

نحوهٔ محاسبه میزان غذا

براساس جدول ۱ که در آن تراکم در استوک‌های جلبک و باکتری مشخص شده، آنگاه میزان غذا براساس روش Coutteau و همکاران (۱۹۹۰)به نسبت‌های مساوی محاسبه و مورد استفاده قرار گرفت. در این رابطه مبنای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

میزان غذای مورد استفاده وزن خشک جلبک دونالیلا مد نظر قرار گرفت (Soltanian et al., 2007). براساس این روش میزان غذادهی در روزهای مختلف (از روز ۱ تا هفتم) متفاوت است که بر همین اساس میزان استفاده از باکتری‌های مورد بررسی نیز در روزهای اول تا هفتم متفاوت است.

جدول ۱ تراکم در استوک‌های جلبک و باکتری‌های مورد مطالعه

نوع باکتری یا جلبک	استوک اولیه	تعداد سلول در هر میلی‌گرم
باکتری *Lactobacillus plantarum*	$۳۲/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱۰×۱۰^{۸}
باکتری *Lactobacillus casei*	$۱۵٤/۵ \times ۱۰^{۸}$	٦۸×۱۰^{۸}
باکتری *Bacillus subtilis*	$٦۰/۵ \times ۱۰^{۸}$	۱٦×۱۰^{۸}
جلبک *Dunallieatertiolecta*	۲۱×۱۰^{٦}	۲۳×۱۰^{٦}

طرح آزمایش

تیمارهای آزمایشی شامل یک تیمار شاهد(جلبک دونالیلا) و ۱۲ تیمار از ۳ باکتری(هرکدام از باکتری‌ها با جایگزینی‌های ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۱۰۰٪) که در مجموع ۱۳ تیمار و هر تیمار با ٦ تکرار طرح‌بندی شد. تغذیه روزانه با تیمارهای مختلف در زیر هود لامینار انجام گرفت. در تمام آزمایش‌ها تیمارهای مختلف با گروه شاهد مقایسه شدند. برای هر تیمار درصد بقا به‌طور روزانه تعیین شد. به این منظور، تعداد آرتمیاهای زنده و شناور پیش از تغذیه روزانه بدون باز کردن در لوله‌های فالکون (به‌منظور حفظ شرایط گنوتوبیوتیک) و با نگه‌داشتن آنها در برابر نور شمارش شدند. در پایان روز ششم پس از تفریخ، به‌منظور اندازه‌گیری طول هر کدام (IL)آرتمیاها در محلول لوگل تثبیت شدند و پس از قراردادن روی لام توسط لوپ و سپس دستگاه دیجیتایزر اندازه‌گیری شدند. پس از آن TBP (Total biomass production) (زیتودهکل) (میلی‌متر در فالکون) طبق فرمول زیر محاسبه شد(Marques et al., 2006).

زیتوده کل (TBP) = تعداد آرتمیاهای زنده در روز ششم × میانگین طول انفرادی

آزمایش مواجهه با باکتری بیماری‌زا

در انتهای روز ششم از تغذیه ناپلی‌های آرتمیاتکرارازهرتیمار با باکتری *Vibrio campbellii*باتراکمی برابر با ۵×۱۰^{٦} cell/ml در هر فالکون مواجهه داده شدند.برای جلوگیری از آلوده شدن با عوامل محیطی اضافه کردن باکتری بیماری‌زا به لوله‌های فالکون درزیر هود لامینار انجام گرفت.تعداد آرتمیای تلف شده در هر تیمار پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از مواجهه شمارش شدند. میزان تلفات به‌صورت درصد در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد مقایسه شد (Marques et al., 2006).

بررسی تثبیت باکتری‌ها در آرتمیا *Artemiafransiscana*

به‌منظور بررسی تثبیت باکتری‌هادر توده بدنی ناپلی آرتمیاهای تغذیه شده با پروبیوتیک‌های باکتریایی، در انتهای دوره آزمایش به‌طور تصادفی تعداد ۱۰ عددناپلی از هر مخزن نگهداری برداشتشدند. برای رفع باکتری‌های سطح بدن، ابتدا ناپلی‌ها در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد به مدت ٦۰ ثانیه قرار گرفتند(Makridis et al., 2001) و سپس با آب مقطر استریل به‌طور کامل شستشو شدند. به‌منظور یکنواخت شدن به هاون چینی استریل منتقل و پس از تهیه هموژن با استفاده از محلول نمکی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

نرمال استریل (نمک کلرید سدیم۰/۸۷درصد)رقت‌های سریالی در دامنه 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه شد.از رقت‌های فوق تحت شرایط استریل، حجمیمعادل۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به پلیت‌های حاوی محیط‌های کشتTryptic Soy Broth و MRS Broth منتقل و در سطح آن پخش گردید. پلیت‌های فوق به‌مدت ٢٤ ساعت درانکوباتور با حرارت۳۰°C انکوباسیون شده و سرانجام واحدهای کلنی(CFU)شمارش شدند (Peter et al., 1986).

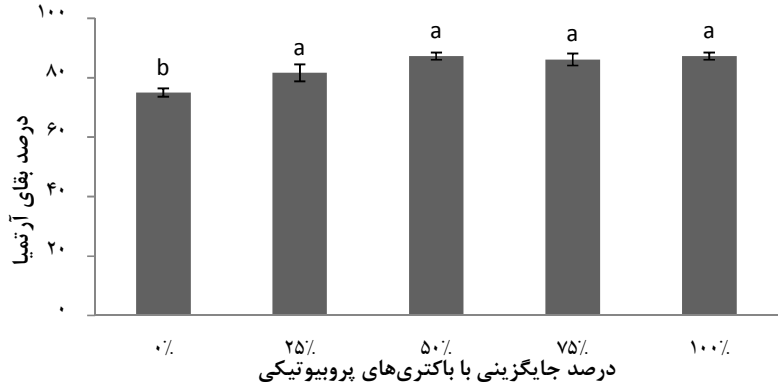
آنالیزهای آماری

در ابتدا طبیعی بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها به‌ترتیب با کمک آزمون‌های کولموگراف-اسمیروف و لون بررسی شدند. پس از اطمینان از طبیعی بودن داده‌ها و برقراری همگنی واریانس‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه برای بررسی معناداری و از آزمون توکی برای بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها و ترسیم نمودارها به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار SPSS-21و اکسل ۲۰۰۷ انجام گردید.

نتایج

درصد بقا پیش از مواجهه با باکتری بیماری‌زا

براساس آنالیز واریانس دو طرفه، اثر نوع باکتری و اثر متقابل آنها بر میزان بقامعنادار نبود، امااثر غلظت‌های متفاوت باکتری‌هابر بقاتأثیرمعناداری داشت.نتایج تأثیر غلظت باکتری‌ها بر بقادرشکل ۱ آمده است. بین درصد بقای ناپلی *A.fransiscana*در روز ششم و پیش از مواجهه با باکتریبیماری‌زایویبریودر تیمار تغذیه شده با باکتری‌های پروبیوتیک و جلبک دونالیلااختلاف معناداری وجود داشت ($p<0/05$). بیشترین درصد بقا و بازماندگی در تیمارهای مورد تغذیه با باکتری‌ها بود و کمترین درصد بقا در تیمار جلبک خالص (با درصد بقای ۷۵ درصد) مشاهده شد.



شکل ۱نمودار درصد بقایناپلی ***A.fransiscana***در غلظت‌های متفاوت جایگزینی با باکتری‌های پروبیوتیکی (پیش از مواجهه با باکتری بیماری‌زا) بدون در نظر گرفتن نوع باکتری

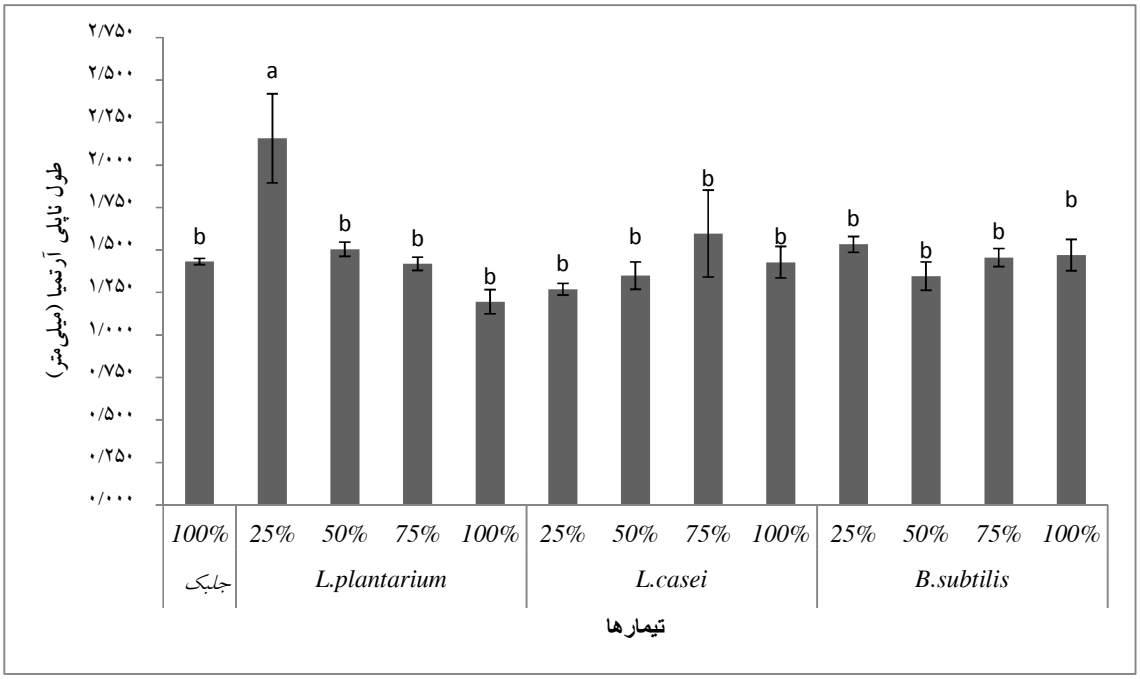
رشد طولی در تیمارها

نتایج آنالیز آماری رشد طولی *A.fransiscana*تغذیه شده با تیمارهای آزمایش، در شکل ۲ آمده است. براساس آنالیز واریانس دو طرفه، اثرهای متقابل بین نوع باکتری و درصد-باکتری‌های پروبیوتیکی تفاوت معناداری در رشد طولی نشان داد($p<0/05$). رشد طولی آرتمیاهای تغذیه شده با

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

مخلوط جلبک دونالیلاو ۲۵ درصد باکتری *L.plantarum*با سایر تیمارها تفاوت معناداریداشت (p<۰/۰۵)،اما تیمارشاهد (۱۰۰ درصد جلبک) با بقیه تیمارها تفاوت معناداریرا نشان نداد(p>۰/۰۵).بیشترین طول (۲/۱٦ میلی‌متر) درتیمار ۲۵ درصد باکتری *L.plantarum*به همراه ۷۵ درصد جلبک دونالیلا وکمترین طول (۱/۲۰ میلی‌متر) در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ درصد باکتری *L.plantarum*مشاهده شد.

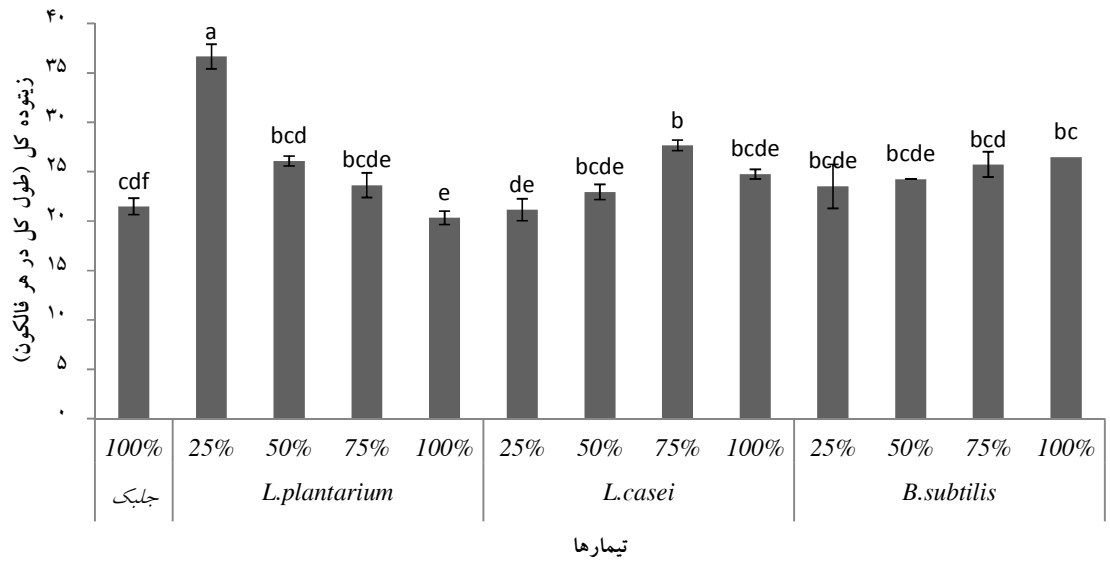


شکل ۲ نمودار طول کل انفرادی ناپلی *A.fransiscana*تغذیه شده با باکتری‌های پروبیوتیک و جلبک دونالیلا در تیمارهای مختلف. در محور افقی ۱۳ تیمار که مربوط به ۳ نوع باکتری (هر کدام با ٤ تیمار) و تیمار شاهد (۱۰۰ درصد جلبک) آمده است. درصدها مربوط به میزان جایگزینی با باکتری به‌جای جلبک به‌عنوان غذای *A.fransiscana*است.

نتایج زیتوده کل با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه در شکل ۳ آمده است. اثرهای متقابل بین نوع باکتری و درصدباکتری‌های پروبیوتیکی در بین تیمارها تفاوت معناداری نشان داد(p<۰/۰۵). زیتوده کل آرتمیاهای تغذیه شده با ۲۵ درصدباکتری *L.plantarum*به همراه ۷۵ درصد جلبک نسبت به بقیه تیمارها به‌طور معناداری بیشتر بود (p<۰/۰۵). بیشترین زیتوده (۳٦/٦۷ میلی‌گرم) درتیمار ۱ با ۲۵ درصد باکتری *L.plantarum*به‌همراه ۷۵ درصد جلبک دونالیلا و کمترین زیتوده (۲۰/۳۳میلی‌گرم) درتیمار با ۱۰۰ درصد باکتری *L.plantarum*یافت شد. تیمار تغذیه شده با ۷۵ درصد *L.casei*و ۲۵ درصد جلبک دونالیلا از نظرزیتوده کلدر رتبه بعدی است (۲۷/٦۷ میلی‌گرم) که به‌طور معنا-داری(p<۰/۰۵) بیشتر از تیمار شاهد بود(شکل ۳).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]



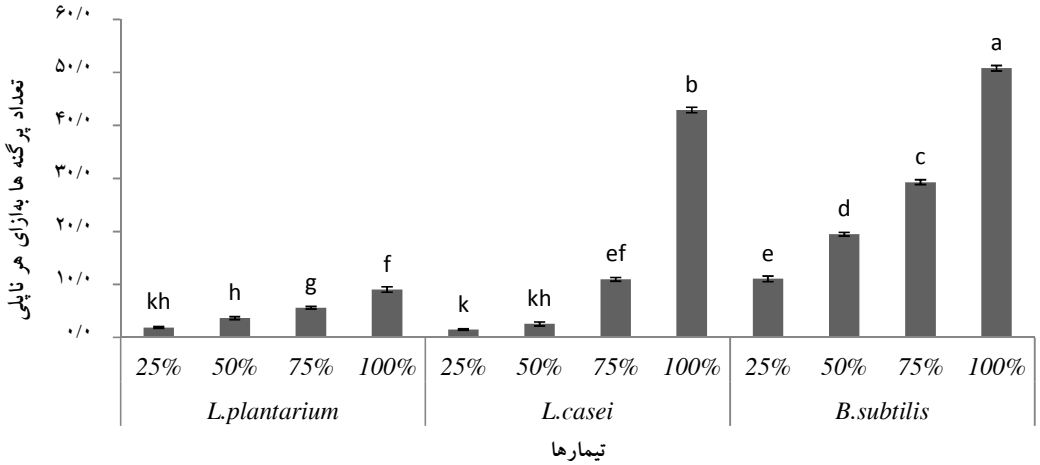
شکل ۳ نمودار زیتوده کل ناپلی *A. fransiscana*تغذیه شده با باکتری‌های پروبیوتیک و جلبک دونالیلا در تیمارهای مختلف. در محور افقی ۱۳ تیمار که مربوط به ۳ نوع باکتری (هر کدام با ٤ تیمار) و تیمار شاهد (۱۰۰ درصد جلبک) آمده است. درصدها مربوط به میزان جایگزینی با باکتری به‌جای جلبک به‌عنوان غذای *A.fransiscana* است.

تعداد پرگنه‌های باکتری در تیمارها

نتایج حاصل از شمارش کلونی‌باکتری‌های مربوط به تیمارهای مورد مطالعه، پس از کشت آرتمیاهای همولیز شده بر روی محیط‌های کشت در شکل٤نشان داده شده است. تعداد کلونی باکتریایی در بین ۳ نوع باکتری استفاده شده به‌عنوان پروبیوتیک، که به‌صورت درصد بیان شده دربین تیمارها تفاوت معناداری نشان داد($p<۰/۰۵$). بیشترین تعداد کلونی باکتریایی مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد *B.subtilis*(۵۲/۸ کلونی به‌ازایهر ناپلی) بود. تعداد کلونی باکتریایی در آرتمیاهای تغذیه شده با ۱۰۰ درصد باکتری*L.casei*(٤۲/۹ کلونی به‌ازای هر ناپلی) و ۷۵ درصد *B.subtilis*(۹ کلونی به‌ازای هر ناپلی) به‌ترتیب در مرتبه دوم و سوم قرار گرفتند. در تیمارهای ۲۵ درصد جایگزینی کمترین تعداد کلونی‌ها مشاهده شد اما در تیمار ۲۵ درصد جایگزینی *B.subtilis* میزان کلنی‌های تثبیت شده نسبت به ۲ باکتری دیگر به‌طور معناداری بیشتر بود($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]



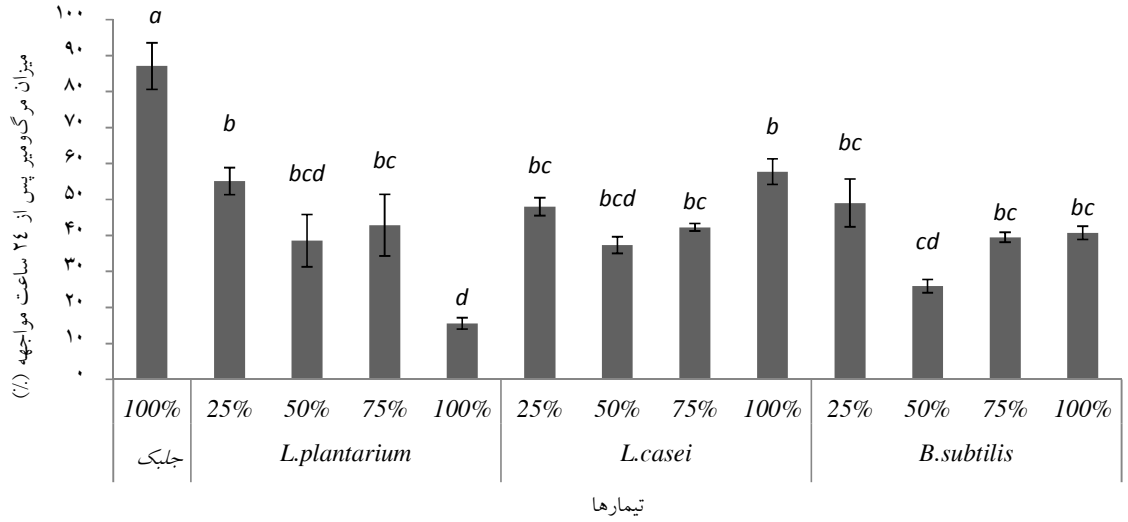
شکل ٤ نمودارمقایسه تعداد پرگنه‌های تشکیل شده از کشت *A. fransiscana* همولیز شده در تیمارهای مورد آزمایش. در محور افقی ۱۳ تیمار که مربوط به ۳ نوع باکتری (هر کدام با ٤ تیمار) و تیمار شاهد (۱۰۰ درصد جلبک) آمده است. درصدها مربوط به میزان جایگزینی با باکتری به‌جای جلبک به‌عنوان غذای *A.fransiscana*است.

مواجهه با باکتری بیماری‌زای ***Vibrio campbellii***

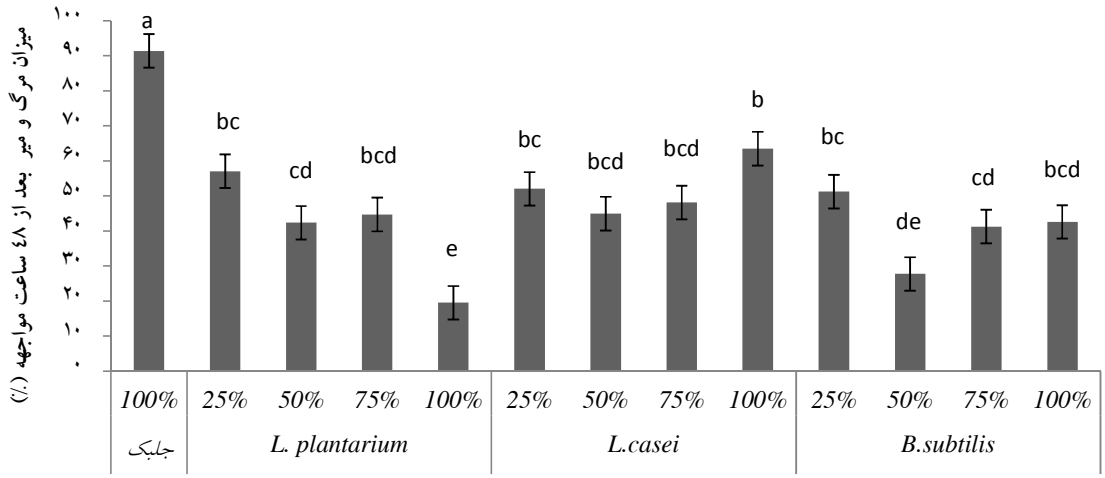
میزان مرگ‌ومیر ناپلی آرتمیاهای تغذیه شده باتیمارهای مختلفدر مواجهه با*V.campbellii*در مدت زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت درشکل‌های۵ و ٦ آمده است. براساس نتایج اختلاف معناداری بین میزان مرگ‌ومیر ناپلی‌ها در تیمارهای مختلف مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). پس از ٢٤ ساعت رویارویی با باکتری *V.campbellii*بیشترین میزان مرگ‌ومیر در آرتمیاهای تغذیه شده با جلبک خالص (جلبک دونالیلا بدون باکتری) (۸۷/۱ درصد) و کمترین میزان مرگ‌ومیر نیز در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ درصد *L.plantarum*(۱۵/٦ درصد) مشاهده گردید.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]



شکل ۵ نمودارمیزان مرگ‌ومیر ناپلی *A. fransiscana* پس از ۲٤ ساعت رویارویی با *V.campbellii*. در محور افقی ۱۳ تیمار که مربوط به ۳ نوع باکتری (هر کدام با ٤ تیمار) و تیمار شاهد (۱۰۰ درصد جلبک) آمده است. درصدها مربوط به میزان جایگزینی با باکتری به‌جای جلبک به‌عنوان غذای *A.fransiscana*است.



شکل ٦ نمودارمیزان مرگ‌ومیر در ناپلی *A.fransiscana* پس از ٤۸ ساعت رویارویی با *V.campbellii*. در محور افقی ۱۳ تیمار که مربوط به ۳ نوع باکتری (هر کدام با ٤ تیمار) و تیمار شاهد (۱۰۰ درصد جلبک) آمده است. درصدها مربوط به میزان جایگزینی با باکتری به‌جای جلبک به‌عنوان غذای *A.fransiscana* است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

با افزایش مدت زمان (٤٨ ساعت) مواجهه با باکتری بیماری‌زا میزان مرگ‌ومیر افزایش یافت،اما روند مرگ‌ومیر در تیمارها همانند مدت زمان ٢٤ ساعت بود. بیشترین میزان مرگ‌ومیر(٩١/٤ درصد) پس از ٤٨ ساعت رویارویی با باکتری *V.campbellii* در تیمار تغذیه شده با جلبک خالص (جلبک دونالیلا بدون باکتری) و کمترین میزان مرگ‌ومیر(١٩/٥٣ درصد) نیز در تیمار تغذیه شده با ١٠٠ درصد *L.plantarum* مشاهده شد. میزان مرگ‌ومیر در تیمار ١٠٠ درصد باکتری *L.casei* در رتبه دوم قرار گرفت، اما به‌طور معناداری نسبت به تیمار شاهد کمتر بود ($p<٠/٠٥$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی باعث کاهش تلفات و افزایش بقا در تیمارهای آزمایشی شده که اختلاف معناداری با تیمار شاهد داشت، اما بین تیمارهای تغذیه شده با انواع باکتری‌ها و غلظت‌های مختلف آنها تفاوت معناداری مشاهده نشد. ناپلی آرتمیا به‌عنوان یک موجود زنده در پرورش لاروی آبزیان استفاده می‌شود و برای غنی‌شدن با پروبیوتیک‌ها و انتقال آن به لاروهای ماهی پتانسیل خوبی دارد (Patra and Mohamed, 2003).افزودن باکتری‌هاپروبیوتیکی با تأثیر مثبت بر کیفیت ذرات غذایی باعث بهبود نرخرشد،بقاو افزایشبیوماس ناپلی‌های آرتمیامی‌شوند(Verschuere et al., 1999).باکتری‌های پروبیوتیک زمانی که به‌عنوان مکمل غذایی به‌کار می‌روند، باعث افزایش نرخ رشد و بقا در بسیاری از آبزیان می‌شوند (Ziaei-Nejad et al., 2006; Ziemer and Gibson, 1998).براساس تحقیق حاضر تأثیر قابل توجه پروبیوتیک‌ها در نرخ رشد و بازماندگی کل احتمالاً می‌تواند به‌دلیل عملکردهای مختلف پروبیوتیک در بدن آرتمیا از جمله دخالت در عمل هضم به‌وسیله تولید آنزیم‌های خارج سلولی (Arellano-Carbajal and Olmos-Soto, 2002)، تولید ویتامین ها و تجزیه ترکیبات غیرقابل هضم (Irianto and Austin, 2002)، تولید ترکیبات ضدباکتریایی (Verschuere et al., 2000) و کاهش سوبسترای موجود برای سایر جمعیت‌های باکتریایی (Fooks and Gibson, 2002) باشد.باکتری‌ها نسبت به جلبک‌ها برای تغذیه آرتمیا انرژی بالایی ندارند و میزان جذب نیتروژن در آرتمیا در هنگام تغذیه با جلبک‌ها بسیار بالاتر از تغذیه با باکتری‌هاست،امادر زمان تغذیه آرتمیا از باکتری به‌همراه جلبک جذب نیتروژن سریع‌تر صورت می‌گیرد(Moore and Jaeckle, 2010). تحقیق حاضر نیز نشان داد زمانی‌که از ٢٥ درصد باکتری لاکتوباسیل پلانتاروم به همراه جلبک دونالیلا استفاده شود، میزان رشد نسبت به سایر حالت‌ها افزایش می‌یابد. استفاده از باکتری ١٠٠ درصد نتایج مشابه‌ای با جلبک ١٠٠درصد از نظر رشد طولی انفرادی ایجاد کرد که این نتایج مخالف نظر Berges و Falkowski(١٩٩٦) است.Berges و Falkowski (١٩٩٦) گزارش کردند که جلبک *D. tertiolecta* دارای آنزیم پروتئاز در سلول‌های خود است. هنگامی‌که این آنزیم با آنزیم‌های ترشحی خود آرتمیا مخلوط می‌شود به شکستن ساختار سلولی باکتری کمک کرده و باعث جذب بهتر باکتری‌ها می‌شود. همچنین حضور جلبک‌ها باعث تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی در روده آرتمیا می‌شود. همچنین مطالعات نشان داد که فعالیت آنزیم ال- تریپسین در آرتمیای تغذیه شده با مخلوط جلبک و باکتری بیشتر از ترشح آنزیم در آرتمیای تغذیه شده با باکتری‌ها به‌تنهایی بود (Moore and Jaeckle, 2010).Marques و همکاران (٢٠٠٤)و Soltanian و همکاران (٢٠٠٧) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک مخمر باعث افزایش زیتوده کل در ناپلی‌های آرتمیا می‌شود.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

میزان غنی‌شدن ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا باهریک از مخلوط‌های باکتریایی به‌کاررفته در این آزمایش با یکدیگر متفاوت بود. تحقیقات متفاوتی در ارتباط با تغییر جمعیت میکروبی آرتمیا صورت گرفته که هدف آنها بهینه‌سازی جمعیت باکتریایی ناپلی آرتمیا به‌منظور ارتقای درصد بقا و ارزش غذایی ناپلی، کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و جلوگیری از انتقال آنها به لاروهای آبزیان بوده است(Verschuere et al., 2000). نتایج شمارش پرگنه‌های تحقیق حاضر نشان داد که گونه‌های باکتریایی پروبیوتیکی به‌طور موفقیت‌آمیزی به درون بدن ناپلی آرتمیا الحاق شدند ولی غلظت باکتری‌های تجمع یافته در آرتمیا به نوع سویه‌های باکتریایی بستگی داشت به‌طوری‌که باکتری *B.subtilis*نسبت به دو گونه دیگر به‌طور مؤثرتری به‌وسیله ناپلی آرتمیا خورده شده و در آن تجمع پیدا کرده است. بیشترین کلونی باکتریایی در بین تیمارها در تیمار ۱۰۰ درصد *B. subtilis* معادل ۵۲/۸ کلونی به‌ازای هر ناپلی مشاهده شد. در تحقیق مشابهی غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با دوسویه ویبریو الگوهای متفاوتی را نشان داد(Gomez-Gil et al., 1998)، به‌طوری‌که یکی ازباکتری‌های الحاقی ابتدا افزایش و سپس ناگهان کاهش یافت و دوباره تا ٢٤ ساعت افزایش شدیدی در سطوح باکتری در ناپلی رخ داد. اما در گونه دیگری در ابتدا افزایش تجمع باکتری در ناپلی رخ داد ولی پس از آن تا ٢٤ ساعت از مقدار سطوح باکتری‌های الحاقی کاسته شد. Jafarian و همکاران (۲۰۰۵) با غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا با سویه‌های مختلف باکتریایی نشان دادند که مخلوط باکتریایی آکوا-۱ که شامل*Bacilluslicheniformis* ، *Bacillus subtilis* و *Bacillus polymyxa*بود،بهترین نتیجه درغنی‌سازی را داشت. Makridis و همکاران (۲۰۰۱) از ۲ سویه PB61 و PB11ویبریو برای غنی‌سازی *A.fransiscana*استفاده کردند و نتایج نشان داد که سویه PB61 کارایی بیشتری دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ناپلی آرتمیا در غنی شدن با گونه‌ها و مخلوط‌های باکتریایی مختلف، رفتارهای متفاوتی از خود بروز می‌دهد که به قدرت کلونی شدن متفاوت باکتری‌های مختلف در بدن ناپلی آرتمیا مربوط است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

باکتری‌های جنس ویبریو عامل مرگ‌ومیر بسیاری از ماهیان دریایی هستند(Horne et al., 1977; Toranzo et al., 1993). ویبریوهابه‌عنوان عامل بیماری‌زای ماهیان توربوت (Austin et al., 1993; Austin and Nordström, 1990)، سیم دریایی (*Sparusaurata*) (Balebona et al., 1998) وهامور (*Epinephelusmalabaricus*)(Lee, 1995) تعریف شده است. این باکتری‌ها همچنین به‌عنوان باکتری فرصت‌طلب در ماهی کفال(*Mugilcephalus L.*)، (Burke and Rodgers, 1981) و سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*)، (Muroga et al., 1987) گزارش شده است.همچنین این باکتری جزء میکروفلور روده‌ای چندین گونه از ماهیان دریایی است (Grisez et al., 1997).دستکاری بار باکتریایی روتیفر و آرتمیا که به‌عنوان غذای آبزیان به‌کار می‌روند، می‌تواند عاملی برای بقا و رشد لاروها باشد (Robertson et al., 2000).Villamil و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که استفاده از *L.casei*و *L.brevis* می‌تواند باعث کاهش *V. alginolyticus*در آرتمیای پرورشی شود. در طی متابولیسم باکتری‌های پروبیوتیکی مواد خارج سلولی از جمله اسید لاکتیک (Alakomi et al., 2000)، اسیدهای آلی (Midolo et al., 1995)، پراکسید هیدروژن، دی اکسیدکربن و باکتریوسین (Naidu et al., 1999) تولید می‌کنند که باعث کاهش رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود. باکتریوسین‌ها پلی پپتیدهای هستند که علیه باکتری‌ها و میکروب‌های گرم مثبت فعالیت

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

می‌کنند (Galvin et al., 1999)،هرچند بعضی از لاکتوباسیلوس‌ها علیه باکتری‌های گرم منفی از جمله *V.anguillarum*، *V.salmonicida* و *Proteus vulgaris*فعالیت می‌کنند (Ringø and Gatesoupe, 1998). اسید ضعیف (اسیدلاکتیک) تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک باعبور از غشای میکروارگانیسم‌ها سبب خروج یون هیدروژن (H^+) و ضعیفشدن سلول و در نهایت تولید باکتریوسین و مواد باکتری کش در سلول می‌شود (Nykänen et al., 1998). از دیگر مکانیسم‌هایی که باعث کاهش باکتری‌های بیماری‌زا توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌شود می‌توان به رقابت بر سر مواد مغذی، انرژی در دسترس و محل مناسب برای نشستن اشاره کرد(Verschuere et al., 2000).مطالعات زیادی دربارهٔتأثیرباکتری‌های پروبیوتیک بر روی ایجاد محدودیت رشدباکتری‌های بیماری‌زا وهمچنین مقاومت در برابر *V.campbellii*انجام شده است(Defoirdt, 2014; Liu et al., 2010; Okumura, 2007).نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک باعث ارتقای درصد بقای ناپلی آرتمیا در زمان مواجهه با باکتری بیماری‌زا*V.campbellii*می‌شود. Marques و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که استفاده از ریزجلبک‌ها به همراه باکتری‌های پروبیوتیک تأثیر مثبتی بر روی بقای آرتمیا در زمان مواجهه با *V.campbellii*دارد. چندین نظریه برای توضیح عملکرد بهتر این باکتری‌ها ارائه شده است که شامل موارد زیر است:۱- آزادسازی مقدار اضافی از مواد مغذی (Marques et al., 2005)، ۲- فعالیت آنزیمی باکتریایی که باعث افزایش قابلیت هضم در آرتمیا می‌شود (Verschuere et al., 1999)،۳- تبدیل مواد غیرقابل دسترس به مواد مغذی قابل دسترس برای آرتمیا (بازیافت مواد مغذی) و بهبود کیفیت آب از این طریق (Verschuere et al., 2000)، ٤- حذف مواد سمی که می‌توانند بر روی رشد و بقای آرتمیا تأثیر بگذارند (Verschuere et al., 1999) و ٥- تحریک سیستم ایمنی آرتمیا که باعث مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود (Marques et al., 2006). در نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در تحقیق حاضر در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد رشد و بقای بیشتری مشاهده شده است. همچنین پروبیوتیک‌ها توانستندتأثیر بهینه بر مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا نشان دهند. از این‌رو براساس این نتایج استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی برای غنی‌سازی و تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا توصیه می‌گردد.

منابع:

Ahmadnia Motlagh, H. R., Farhangi, M., Rafiee, G., Noori, F. 2013. Effects of Different Level Administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance and survival rate of *Artemia urmiana*. *Journal of fisheries*. 65: 353-364 (Abstract in english)

Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M ,Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*. 66**:** 2001-2005.

Arellano-Carbajal, F., Olmos-Soto, J. 2002. Thermostable α-1-4 and α-1, 6-glucosidase enzymes from *Bacillus sp.* isolated from a marine environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18**:** 791-795.

Austin, B., Stobie, M., Robertson, P., Glass, H., Stark, J., Mudarris, M. 1993. Vibrio alginolyticus: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. *Journal of Fish Diseases*. 16**:** 277-280.

Austin, S., Nordström, K. 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell*. 60**:** 351-354.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*. 155**:** 387-399.

Haq, M., Vijayasanthi, P., Vignesh, R., Shalini, R., Chakraborty, S., Rajaram, R., 2012. Effect of Probiotics against Marine Pathogenic Bacteria on *Artemia franciscana*.*Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2 : 38-43

Horne, M., Richards, R., Roberts, R., Smith, P. 1977. Peracute vibriosis in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fish Biology*. 11**:** 355-361.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 25**:** 633-642.

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition*. 73**:** 444-450.

Jabari, sh. 2014. The effect of probiotics *Pediococcus acidilactici* on growth performance, gut microbiota and production of cysts Artemia franciscana. M.s.c thesis. Gorgan university. 95 pp (In Persian)

Jafarian, H. Azaritakami, Gh. Kamali, A. Soltani, M. Habibi-rezaee, M. 2005. Enrichment of Artemia Urmiana with mix of five species of Bacilluspermeabilizes Gram-positive probiotics. *Journal of Iranian Marine science*. 4(1-2):11-21(In persian)

Kurtz, J., Franz, K. 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*. 425: 37-38.

Lee, K.-K. 1995. Pathogenesis studies on Vibrio alginolyticus in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microbial Pathogenesis*. 19**:** 39-48.

Liu, K.-F., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Cheng, W., Liu, C.-H. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*. 28**:** 837-844.

Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurataL.*). *Applied and environmental microbiology*, 4275-4269: 64

Berges, J.A., Falkowski, P.G. 1996. Cell-Associated proteolytic enzymes from marine phytoplankton1. *Journal of phycology*. 32**:** 566-574.

Burke, J ,.Rodgers, L. 1981. Identification of pathogenic bacteria associated with the occurrence of 'red spot'in sea mullet, *Mugil cephalus* L., in south-eastern Queensland. *Journal of fish diseases*. 4**:** 153-159.

Cavalier-Smith, T. 2003. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*. 39**:** 338-348.

Coutteau, P., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: Artemia as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society*. 21**:** 1-9.

Defoirdt, T. 2014. Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 6**:** 100-114.

Fooks, L., Gibson, G. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88**:** 39-49.

Galvin, M., Hill, C ,.Ross, R. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in applied microbiology*. 28**:** 355-358.

Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Abreu-Grobois, F.A., Roque, A. 1998. Bioencapsulation of Two Different VibrioSpecies in Nauplii of the Brine Shrimp *(Artemia franciscana*). *Applied and environmental microbiology*. 64**:** 2318-2322.

Gordon, H., Pesti, L., 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological reviews*. 35: 390–429.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

Nykänen, A., Vesanen, S., Kallio, H. 1998. Synergistic antimicrobial effect of nisin whey permeate and lactic acid on microbes isolated from fish. *Letters in applied microbiology*. 27**:** 345-348.

Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (*Penaeidins and crustin*), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*. 22**:** 68-76.

Patra, S., Mohamed, K. 2003. Enrichment of Artemia nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic Vibrio. *Aquaculture International*. 11**:** 505-514.

Raa, J. 2000.The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. Avances en nutrición acuicola v. memorias del V simposium internacional de nutrición acuicola. 19**:** 22-35.

Ringø, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160**:** 177-203.

Robertson, P., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B. 2000. Use of Carnobacterium sp .as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. 185**:** 235-243.

Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2007. Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown Artemia. *Fish & shellfish immunology*. 23**:** 141-153.

Sorgeloos,P. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture, Artemia Ref. State univ. Ghent, Belgium. 319p.

Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert,W., Versichele, D., 1986. Manunual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture. Artemia Reference Center. Faculty of Agriculture, State University of Ghent, Belgium. 318 pp

Toi, H.T., Boeckx, P., Sorgeloos, P., Bossier, P., Van Stappen, G. 2014. Co-feeding of microalgae

Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J., Vadstein, O. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in Artemia metanauplii to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International*. 9**:** 225-235.

Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2005. Effects of bacteria on*Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Applied and environmental microbiology*. 71**:** 4307-4317.

Marques, A., François, J.-M., Dhont, J., Bossier, P., Sorgeloos, P., 2004.Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically grown Artemia. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 310: 247-264.

Marques, A., Thanh, T.H., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2006a. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic Artemia against different pathogens. *Aquaculture*. 258**:** 116-126.

Marques, A., Thanh, T.H., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006b. Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic Artemia against different pathogens. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 334: 20-30.

Midolo, P., Lambert, J., Hull, R., Luo, F., Grayson, M. 1995. In vitro inhibition of Helicobacter pylori NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: 475-479

Moore, K., Jaeckle, W. 2010. Bacteria not an energetically favorable food source for *Artemia salina* larvae. In: Twenty-First Annual Illinois Wesleyan University John Wesley Powell Student Research Conference.

Muroga, K., Higashi, M., Keitoku, H.1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*. 65**:** 79-88.

Naidu, A., Bidlack, W., Clemens, R. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical reviews in food science and nutrition*. 39**:** 13-126.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

Strains. *Applied and environmental microbiology*. 65**:** 2527-2533.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64**:** 655-671.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*. 219**:** 43-56.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., 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**:** 516-524.

Ziemer, C.J., Gibson, G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*. 8**:** 473-479.

and bacteria may result in increased N assimilation in Artemia as compared to mono-diets, as demonstrated by a 15 N isotope uptake laboratory study. *Aquaculture*. 422**:** 109-114.

Toranzo, A., Novoa, B., Romalde, J., Núñez, S., Devesa, S., Marino, E., Silva, R., Martinez, E., Figueras, A ,.Barja, J. 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture*. 114**:**189-202.

Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155**:** 401-417.

Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiological research.* 158 (4), 299–308.

Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1999. Microbial Control of the Culture ofArtemia Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 4, No. 4, Winter 2016

Effect of three probiotics (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *Bacillus subtilis*) on growth and survival of *Artemia franciscana* nauplii against pathogenic bacteria, *Vibrio campbellii*, in gnotobiotic condition

Nasrollah Ahmadifard[1*], Amir Tockmechi[2], Masoud Mehrabi[3]

1- Assistant Professor, Department of Fisheries and Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Iran

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Iran

3- M.Sc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Iran

Received : 27/06/2015 Accepted : 08/12/2015

*Corresponding author: N.ahmadifard@urmia.ac.ir

Abstract:

The effect of three probiotics (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei* and *Bacillus subtilis*) on growth and survival of artemia against a pathogenic bacteria, *Vibrio campbellii*, in gnotobiotic conditions were investigated. A total of 1560 nauplii were equally transferred to 78 falcon tube containing 30 ml of autoclaved sea water with 70 ppt salinity. Treatments consisted of a control (alga, *Dunaliella tertiolecta*) and 12 treatments of 3 bacteria (each with 25%, 50%, 75%, and 100% replacement) and each treatment was done in 6 replicates. On the sixth day, survival rate, length and the number of bacterial colonies in the nauplius were studied. Also, in this day the nauplius was challenged with the pathogenic bacteria, *V. campbellii*. The maximum length of the nauplius was observed in the group supplied with 25% *L. plantarum* and 75% of alga ($P<0.05$). The results of bacterial colonies showed significant differences between groups ($P<0.05$). The highest and lowest number of colony were shown in groups supplied with 100% *B. subtilis* and 25 % *L. casei,* respectively. Based on challenge results, after 24 and 48 h of challenging with the pathogenic bacteria, the groups supplied with 100% *L. plantarum* showed the highest survival rate and the lowest survival was in group fed with 100% alga. In conclusion, the use of 25% *L. plantarum* combined with algae showed a better performance than the *L. casei* and *B. subtilis*.

Keywords: Probiotics, *Artemiafransiscana, Vibrio campbellii,* Gnotobiotic

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1394.4.4.9.3]