

## مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی باسیلوس و لاکتوباسیلوس به‌عنوان غذای زنده بر روی پارامترهای رشد و بازماندگی بجه ماهیان انگشت قد تاسی ماهی روسی (*Acipenser baerii*)

### چکیده

این تحقیق باهدف تعیین قابلیت غنی‌سازی کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) با استفاده از پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس و تأثیر آن بر رشد و بازماندگی بجه‌تاس ماهی سبیری انجام شد. در تحقیق حاضر از پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس محلول در چربی در غلظت‌های  $10^4$  (تیمار ۱)،  $10^5$  (تیمار ۲)،  $10^6$  (تیمار ۳) و صفر (تیمار ۴) عدد کلنی تشکیل شده در گرم استفاده شد. در پایان ۳ بجه ماهی از هر تشتک به‌صورت تصادفی انتخاب، بیومتری و برای تعیین فلور میکروبی روده به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از اتمام دوره نتایج حاصل از بیومس نهایی، درصد افزایش وزن، ضریب چاقی، نرخ رشد ویژه، میانگین رشد روزانه، ضریب تبدیل غذایی در تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد. نتایج نشان داد تعداد باکتری‌های موجود تیمارها در کرم نرئیس روند افزایشی داشت و در شاهد از کمترین میزان برخوردار بود و بین تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. طبق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه تعداد باکتری‌های موجود در روده بجه‌تاس ماهی سبیری غنی‌شده با پروبیوتیک بر روی محیط کشت MRS بین همه تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد میزان شمارش کلی باکتریایی تیمارها روند افزایشی نداشت. به‌طوری‌که، تعداد باکتری‌های موجود در تیمار ۲ یا غلظت  $10^2$  عدد کلنی تشکیل شده در گرم از تیمار ۳ با غلظت  $10^3$  عدد کلنی تشکیل شده در گرم بیشتر بود و در شاهد از کمترین میزان برخوردار گردید و بین تیمارها با شاهد نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که تعداد باکتری‌های موجود در روده بجه‌تاس ماهیان سبیری بیشتر از کرم نرئیس بود. نتایج نشان داد تعداد باکتری‌های موجود در کرم نرئیس در تیمار ۳ بیشتر از سایر تیمارها بود و این در حالی است که میزان توتال باکتریایی در روده بجه‌تاس ماهی سبیری در تیمار ۲ بیشتر از سایر تیمارها مشاهده گردید. بنابراین، می‌توان از کرم نرئیس به‌عنوان حامل برای انتقال زیست‌یار حیاتی باسیلوس و لاکتوباسیلوس جهت استفاده در جیره غذایی آبزیان دریایی مانند انواع میگو و بجه ماهیان و غیره استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*)، کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*)، غنی‌سازی، پروبیوتیک.

### مقدمه

صنعت آبزی‌پروری علیرغم رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی مانند ابتلا به بیماری در ماهیان و میگوهای پرورشی به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس‌زا مواجه بوده است. اغلب این آبزیان پرورشی تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار می‌گیرند که سیستم ایمنی-

اسماعیل فرزانه<sup>۱</sup>

حسین خارا<sup>۲\*</sup>

ذبیح اله پزند<sup>۳</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، پردیس علوم و تحقیقات گیلان، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲. گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۳. موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

\*مسئول مکاتبات

h.khara1974@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۶۰۲۰۵۳۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۹

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی

می‌باشد.

شان توسط شرایط استرس‌زا به خطر می‌افتد. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان این عفونت‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب در درمان بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شوند. با این حال، استفاده نامناسب و بیش‌ازحد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به پیدایش سویه‌های مقاوم باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهی می‌شود (Nomoto, 2005). آنتی‌بیوتیک‌ها به تعادل باکتری‌های موجود در روده آسیب وارد می‌کنند. اکثر باکتری‌های مفید را از بین برده و منجر به پیدایش باکتری‌های مقاوم به دارو می‌گردند و فقط ۲۰ تا ۳۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌ها به‌وسیله ماهی هضم می‌شوند و بقیه وارد محیط‌زیست می‌شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی جدید آبی‌پروری همگام با محیط‌زیست به شمار می‌رود. با استفاده از این مواد هم می‌توان تولید را افزایش داد، هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم اینکه آن‌ها را به‌عنوان مبارزه بیولوژیک مدنظر قرارداد (حسینی فر و پورامینی، ۱۳۸۶). علاوه بر این، داروهای ضد میکروبی در آبی‌پروری می‌تواند به دلیل گسترش سریع آنتی‌بیوتیک از طریق آب یک مشکل جدی در محیط‌زیست ایجاد کنند و این هشداردهنده است.

تأثیر پروبیوتیک‌ها در تغذیه، مقاومت در برابر بیماری‌ها و دیگر فعالیت‌های مفید باثبات رسیده است که از جمله اثرات مفیدی که بر سلامتی دارند، تأثیر بر سیستم ایمنی و تحریک سیستم ایمنی است (کامکار و همکاران، ۱۳۹۰). استفاده از زیست‌پارهای حیاتی (پروبیوتیک‌ها) به‌عنوان یک مکمل غذایی که قادر به بهبود دفاع و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در زمان بروز استرس‌های متفاوت طی دوره پرورش ماهی باشند، موردتوجه هستند. پروبیوتیک‌ها به‌طور سودمندی با بهبود تعادل فلور میکروبی روده به میزان سود می‌رسانند. پروبیوتیک‌ها نه‌تنها اثرات منفی آنتی‌بیوتیک‌ها را ندارند، بلکه نقش مهمی در افزایش بهره‌وری، تولید و کاهش درصد تلفات ماهی و میگو دارا می‌باشند (Fuller, 1989). امروزه پروبیوتیک‌ها یا مکمل‌های میکروبی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها قرار می‌گیرند. استفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران دانست که به‌عنوان شاخص‌های بیولوژیک باعث افزایش تولید در واحد سطح می‌شوند (قشقای و لایق، ۱۳۸۳). به‌منظور افزایش رشد و کوتاه نمودن دوره پرورش ماهیان خاویاری، راهکارهای مختلفی نظیر استفاده از محرک‌های ایمنی، پروبیوتیک‌های میکروبی و پری‌بیوتیک‌ها معرفی شده و به‌صورت پراکنده نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. انتخاب پروبیوتیک‌ها برای آبی‌پروری معمولاً بر اساس ویژگی آنتاگونیست بودن آن‌ها نسبت به عوامل بیماری‌ها می‌باشد. اگرچه مواردی مانند رشد، اتصال به موکوس روده و تولید ترکیبات مفید نیز باید در نظر گرفته شود (Gomez-Gil et al., 2000).

یکی از مهم‌ترین مسائل موردتوجه در آبی‌پروری، تأمین غذای مناسب برای آبزیان می‌باشد. کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) به‌عنوان غذای زنده در پرورش آبزیان به خاطر دارا بودن حدود ۵۲ درصد پروتئین، ۱۴ الی ۲۳ درصد چربی و اکثر اسیدهای چرب در حد مطلوب، بهترین غذا به شمار می‌رود (پژند و همکاران، ۱۳۸۸). غنی‌سازی فرآیندی است که در آن در طی یک دوره زمانی بر اساس بیولوژی موجود تغذیه با ترکیبات مغذی، ارزش غذایی کرم نرئیس افزایش یافته و آن را به یک غذای کامل تبدیل می‌کند (Doyle et al., 1995).

با توجه به اینکه اغلب پرورش‌دهندگان میگو در مراحل بلوغ از کرم نرئیس استفاده می‌نمایند (Olive, 1999; Chung et al., 2011). بنابراین، غنی‌سازی کرم نرئیس با پروبیوتیک‌های بالابرنده پاسخ‌های ایمنی و پیشگیری‌کننده بیماری‌ها می‌تواند بسیار مفید باشد. این تحقیق می‌تواند روش به‌کارگیری باسیلوس و لاکتوباسیلوس را برای پرورش‌دهندگان آبزیان مشخص نماید تا با دانستن میزان آن در جیره غذایی کرم نرئیس در کاربرد آن اقدام گردد. تاکنون غنی‌سازی کرم نرئیس با باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس در ایران صورت نگرفته است. دانستن زمان و میزان غنی‌سازی کرم نرئیس برحسب عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم این باکتری می‌تواند برای دست‌اندرکاران تفریحگاه‌های میگو و ماهی بسیار مفید باشد. چون با دانستن نتایج این تحقیق گام‌های پیشگیری از بیماری‌ها و افزایش پاسخ‌های ایمنی و فاکتورهای رشد با اطمینان بیشتری برداشته خواهد شد. غنی‌سازی کرم نرئیس با پروبیوتیک تاکنون انجام‌نشده است. اما این کرم با استفاده از جلبک‌ها و مواد آلی حاصل از تجزیه مواد مغذی پساب آبی‌پروری غنی‌سازی گردید. غنی‌سازی کرم نرئیس با باکتری فرآیندی است که طی آن شرایطی مهیا می‌گردد تا از این ارگانیزم نه‌تنها به‌عنوان یک غذای زنده، بلکه به‌عنوان یک حامل برای تلقیح واکسن‌های خوراکی و باکتری‌ها به ماهیان در مراحل لاروی

آن‌ها استفاده گردد (Makridis et al., 2001). با توجه به مطالعات اندک در خصوص تاس ماهی سبیری (*A. baerii*) خصوصاً تغذیه آن در ایران، لزوم انجام این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس بر روند رشد و بقاء این ماهی ضروری به نظر می‌رسد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات تاس ماهیان دریای خزر در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. جهت انجام کار از ۱۲ مخازن فایبرگلاس به حجم ۵۰۰ لیتر مخلوط آب چاه و رودخانه استفاده گردید. در تمام دوره تحقیق، آب مخازن نیم‌تنی حاوی ماهی به‌صورت مداوم با هواده مرکزی مؤسسه هواده‌ی شد و آب مخازن روزانه طی یک مرحله تعویض شد.

۳۶۰ قطعه بچه تاس ماهی سبیری از مرکز تکثیر ماهیان خاویاری شهید بهشتی تهیه‌شده و به‌وسیله مخازن مجهز به هواده به مؤسسه بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر انتقال یافت. ماهیان ابتدا به مدت یک هفته با غذای تجاری سازگار شدند. در این بررسی نمونه خالص‌سازی شده باکتریایی شامل باکتری‌های *Lactobacillus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* و *rhamnosus* بود که از شرکت زیست‌پار وارنا بانام تجاری سوپر زیست آزیان تهیه گردید. در این بررسی پروبیوتیک مورد‌استفاده بانام پروبیوتیک باکتری‌های گروه B و L بیان شد.

زیست‌سنجی طی یک دوره ۳۰ روزه انجام گرفت. در هر زیست‌سنجی از هر یک از ۱۲ مخازن به‌طور تصادفی ۱۰ عدد ماهی نمونه‌برداری شده و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم وزن کرده و با تخته بیومتری طول کل بدن آن‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. میزان غذایی با توجه به وزن ماهی ۲۰-۳۰ درصد وزن تاس ماهی تعیین گردید. غذایی ۳ بار در روز در ساعات ۸ صبح، ۱۱ ظهر و ۳ بعدازظهر صورت گرفت. به‌منظور تغذیه تاس ماهی سبیری از غذای کنسانتره با فرمول جیره غذایی ماهیان خاویاری استفاده گردید. تیمارهای مختلف بر اساس جیره‌های آزمایشی ساخته‌شده شامل پودر ماهی، آرد گندم، کنجاله سویا، پودر گوشت، شیر خشک، سبوس گندم و روغن گیاهی آفتابگردان، در جیره غذایی مورد آزمایش قرار گرفت.

باکتری موردنظر با سه سطح به غذای موردنظر اضافه گردید. در این تحقیق از ۳ تیمار حاوی پروبیوتیک به همراه شاهد استفاده شد. تیمارهای مختلف بر اساس جیره‌های آزمایشی ساخته‌شده در مقادیر ۰/۲۵، ۲۵ و ۲۵۰ گرم در یک‌تن غذا به‌عنوان سه تیمار و همچنین یک تیمار شاهد بدون افزودن پروبیوتیک و هر تیمار با سه تکرار انجام شد. برای تهیه غذا، ابتدا با توجه به میانگین وزنی ماهیان و دمای آب، مقدار غذای هر تیمار محاسبه‌شده و سپس غذای هر تیمار روی سینی مخصوص آن پخش‌شده و پروبیوتیک روی آن اسپری شد. سپس غذای تهیه‌شده در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت کاملاً خشک گردید. غذا هر دو روز یک‌بار تهیه و در ظرف‌های پلاستیکی دربسته در داخل یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و استفاده شد. غذایی به کرم‌های نرئیس یک‌بار در روز انجام شد. پس از خشک شدن غذا در دمای اتاق، جهت کسب اطمینان از حضور پروبیوتیک در غذا (به مقدار موردنظر)، ۱۰ گرم از غذای هر تیمار جهت اندازه‌گیری پروبیوتیک، به آزمایشگاه باکتری-شناسی انتقال یافت.

برای ساخت جیره ابتدا مقادیر موردنظر پروبیوتیک ( $10^{10}$  CFU/g B و L) را در ۱۰ میلی‌لیتر روغن مایع آفتابگردان حل نموده، آن را خوب به هم زده تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس روغن آماده‌شده به جیره ساخته‌شده اضافه گردید. در این آزمایش میزان غنی‌سازی کرم نرئیس با پروبیوتیک طی مدت ۲ ماه پرورش موردبررسی قرار گرفت.

جیره ۱: حاوی  $10^4$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم باکتری در هر گرم از جیره غذایی

جیره ۲: حاوی  $10^5$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم باکتری در هر گرم از جیره غذایی

مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی ... / فرزانه و همکاران

جیره ۳: حاوی  $10^6$  عدد کلنی تشکیل شده در گرم باکتری در هر گرم از جیره غذایی

جیره ۴ (کنترل): فاقد پروبیوتیک بوده و به‌عنوان شاهد انتخاب گردید.

غذای فوق حاوی ۴۴ درصد پروتئین، ۱۰ درصد چربی، ۳ درصد فیبر بود (محسنی و همکاران، ۱۳۸۵).

جهت پرورش کرم نرئیس ابتدا سه مخزن ۴۰ لیتری برای هر تیمار آزمایشی و در مجموع ۱۲ مخزن برای کلیه تیمارها و تکرارهای پیش‌بینی شده در نظر گرفته شد. رسوب موردنیاز کف مخازن شامل ماسه ریز الک شده با چشمه ۵۰۰ میکرون ابتدا کاملاً با آب تمیز شستشو گردید و جهت ضدعفونی آن از کلر ۱۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد تا بستری عاری از هرگونه موجود زنده تهیه گردد. درون هر مخزن که حاوی ۵ سانتی‌متر رسوب در بستر بود، تعداد ۵۰۰ کرم با میانگین وزن  $10 \pm 2$  میلی‌گرم انتقال داده شد و هر کرم تا رسیدن به وزن ۲۰۰ میلی‌گرم پرورش داده شد (پژند و همکاران، ۱۳۸۸).

پس از غنی‌سازی کرم نرئیس با پروبیوتیک، برداشت و جمع‌آوری کرم نرئیس غنی‌سازی شده در شرایط استریل صورت گرفت. برای انجام کشت باکتریایی ابتدا نمونه موردنظر را توسط آب استریل شستشو داده تا پروبیوتیک و سایر باکتری‌های موجود در سطح بدن کرم نرئیس از آن جدا گردیده و اطمینان لازم از دقت در آزمایش حاصل گردد. پس از شستشو کرم نرئیس روی الک آن‌ها به ظرف استریل انتقال یافتند. سپس این کرم‌ها را هم‌وزنه نموده تا سوسپانسیون موردنظر به دست آید و آماده کشت گردد. هم‌چنین جهت شمارش فلور باکتریایی آب پرورشی ۵۰ میلی‌لیتر از آب محیط پرورش در ظرف استریل به آزمایشگاه منتقل گردید و یک میلی‌لیتر از آن در شرایط استریل نمونه‌برداری و مورد کشت میکروبی قرار گرفت. برای انجام کشت باکتریایی و شمارش آن‌ها در ابتدا رقت‌های مختلف از ۱-۱۰ تا ۱۰-۱۰۰ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت توسط سمپلر روی محیط کشت ریخته و توسط آنس استریل به‌صورت سطحی کشت انجام می‌شود. همه پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مورد انکوباسیون قرار گرفت و پس‌ازاین زمان باکتری مورد شمارش قرار گرفته و برحسب (عدد کلنی تشکیل شده در گرم) به ازای کرم نرئیس یا آب محیط گزارش گردید.

آزمایش‌های میکروبی در یک مرحله پس از ۱ ماه از آغاز تغذیه تاس ماهی سبیری با کرم نرئیس غنی‌سازی شده انجام پذیرفت. تعداد باکتری‌های کل موردبررسی قرار گرفت. برای انجام آزمایش‌های میکروبی از هر تیمار سه ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تعیین فلور میکروبی روده پس از شستشو با سرم فیزیولوژی استریل، در ظروف استریل در کنار یخ در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل گردید. بچه ماهیان نیز پس از انتقال به آزمایشگاه زیست‌سنجی شده و پس از ضدعفونی سطح شکمی ماهیان با الکل ۷۰ درصد، در شرایط استریل اقدام به باز کردن شکم ماهی گردید. پس از جمع‌آوری روده محتویات (روده) آن تخلیه و توسط سرم فیزیولوژی سه بار مورد شستشو قرار گرفت. پس از توزین در داخل ظروف شیشه‌ای استریل درب سمباده‌ای، سرم فیزیولوژی جهت تهیه رقت موردنظر به آن اضافه شد. معمولاً رقت‌های تهیه شده از  $10^{-1}$  تا  $10^{-6}$  بر اساس روش استاندارد رقیق‌سازی شد (Pollock et al., 2002).

به‌منظور کشت و شمارش باکتری‌ها از محیط کشت MRS آگار استفاده گردید (Hagi et al., 2004) و عملیات استریلیزاسیون در داخل اتوکلاو و انتقال به پلیت‌های استریل برای نگهداری در یخچال صورت گرفت. با استفاده از پپیت استریل یک قطره (۰/۰۳ میلی‌لیتر) از لوله‌آزمایش حاوی محلول ذخیره برداشته و روی محیط کشت MRS ریخته شد و با استفاده از فیلد و پلاتین استریل اقدام به کشت با روش خطی گردید. سپس نمونه‌ها به داخل ظرف شیشه‌ای حاوی گازپک نوع C (*Microaerophila*: کم اکسیژن دوست) منتقل و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور نگهداری گردیدند (Ringo et al., 2005). پس از کشت، کلنی‌های موجود در هر پلیت به‌منظور تعیین تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. تعداد باکتری‌ها برحسب رقت‌های مورد استفاده تعیین شده و بر اساس عدد کلنی تشکیل شده در گرم مشخص شدند.

فاکتورهای رشد شامل ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، شاخص وضعیت (FC)، میانگین سرعت رشد (GR) و بررسی درصد زنده‌مانی (SR%) ماهیان در تیمارهای مختلف آزمایش و شاهد بررسی گردید. به‌منظور ارزیابی روند رشد، علاوه بر اندازه‌گیری وزن و طول کل ماهیان، شاخص‌های رشد بر اساس منابع موجود از معادلات ریاضی محاسبه شدند (Kissil *et al.*, 2001; Marzouk *et al.*, 2008).

میانگین رشد روزانه (Average Daily Growth) ADG%

$$ADG(g / fish / day)(\%) = \left[ \frac{W_t - W_i}{W_i \times T} \right] \times 100$$

درصد افزایش وزن بدن (Percent Body Weight Increase) PBWI

$$PBWI(\%) = \left[ \frac{W_t - W_i}{W_i} \right] \times 100$$

ضریب (سرعت) رشد ویژه (Specific Growth Rate) SGR

$$SGR(day) = \left[ \frac{\ln W_t - \ln W_i}{T} \right] \times 100$$

ضریب کیفیت (چاقی) K (Condition Factor)

$$K = \frac{W_t}{L^3} \times 100$$

ضریب تبدیل غذایی (Feed Conversion Ratio) FCR

$$FCR = \frac{C \times T}{W_t - W_i}$$

در معادلات مذکور؛

Wi = وزن اولیه ماهی،

Wt = وزن نهایی ماهی،

T = طول مدت پرورش

C = مقدار غذای خورده شده روزانه

L = طول ماهی،

Ln wt = لگاریتم طبیعی وزن نهایی برحسب گرم

Ln wi = لگاریتم طبیعی وزن اولیه برحسب گرم

t = طول دوره پرورش برحسب روز

جهت تجزیه تحلیل آماری از نرم‌افزارهای SPSS و ویرایش سیستم و Excel استفاده شد. به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در نمونه‌های موردبررسی از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. سپس برای مقایسه میانگین بین تیمارهای تغذیه‌ای از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA One-Way) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون دانکن استفاده گردید. اختلاف بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۵ درصد تعیین می‌گردد. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد.

## نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری دمای آب، اکسیژن محلول، pH و درصد اشباع اکسیژن آب در حوضچه‌های پرورش بچه تاس ماهیان سیبری مورد بررسی نشان داد که دامنه تغییرات دمای آب ۲۳/۴-۲۱/۷ درجه سانتی‌گراد، دامنه اکسیژن محلول آب ۷/۲-۵ میلی‌گرم در لیتر، میزان pH آب ۸/۳-۶/۶ و درصد اشباع اکسیژن محلول ۸۶-۴۸/۶ اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱: دامنه تغییرات دمای آب، اکسیژن محلول و pH در حوضچه‌های پرورش بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) طی دوره پرورش

تیمارها	دما (درجه سانتی‌گراد)	اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	pH	درصد اشباع اکسیژن
۱	۲۱/۷-۲۳/۴	۵-۶/۴	۶/۶-۶/۸	۴۸/۶-۷۶/۴
۲	۲۱/۶-۲۳/۱	۵/۸-۷/۲	۶/۶-۶/۷	۵۶-۶۷/۳
۳	۲۱/۳-۲۲/۸	۵/۷-۵/۹	۸/۲-۸/۳	۶۳/۹-۸۶
۴ (شاهد)	۲۱/۷-۲۲	۵/۳-۷	۶/۹-۷	۵۲/۴-۷۰/۹

در این بررسی اختلاف معنی‌داری در طول اولیه ماهیان وجود نداشت. بر اساس آزمون تجزیه یک‌طرفه واریانس و چند دامنه دانکن میانگین طول ماهیان بین تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که تیمار ۳ (غنی‌سازی کرم نرئیس با جیره حاوی  $10^7$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم پروبیوتیک در هر گرم از جیره غذایی) از بالاترین میانگین طولی در بچه تاس ماهیان سیبری برخوردار بود. بر اساس آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های وزنی در تکرارها و تیمارها از توزیع نرمال برخوردار بوده و اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). کمترین و بیشترین میزان وزن نهایی بچه تاس ماهیان سیبری مربوط به تیمار ۱ (غنی‌سازی کرم نرئیس با جیره حاوی  $10^5$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم پروبیوتیک در هر گرم از جیره غذایی) و ۲ (غنی‌سازی کرم نرئیس با جیره حاوی  $10^6$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم پروبیوتیک در هر گرم از جیره غذایی) بود.

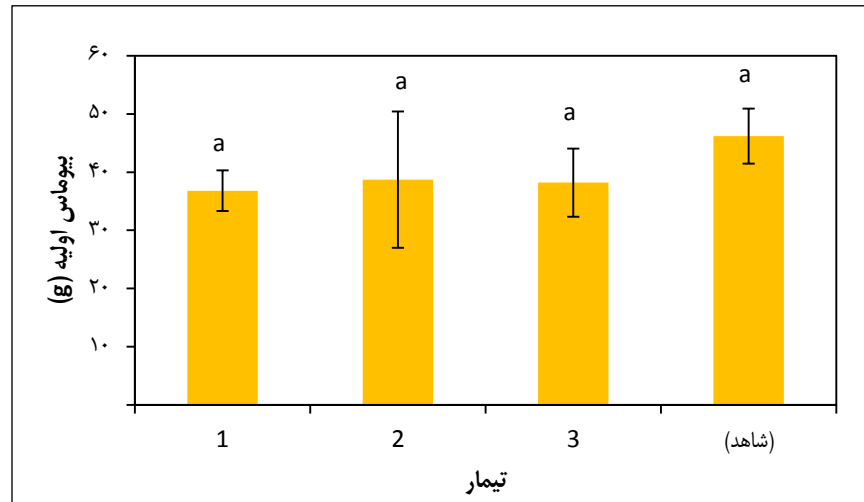
جدول ۲: مقایسه میانگین طول اولیه، ثانویه، وزن اولیه و ثانویه بچه تاس ماهیان سیبری (*Acipenser baerii*) در

## تیمارهای مختلف

تیمارها	تکرار	طول اولیه (سانتی‌متر)	طول ثانویه (سانتی‌متر)	وزن اولیه (گرم)	وزن ثانویه (گرم)
۱	۳	۱۴/۴۳±۰/۷۵ a	۱۹/۶۶±۱/۶۰ a	۹/۲۶±۱/۱۶ a	۱۹/۷±۵/۱۸ a
۲	۳	۱۶/۵±۱/۳۲ a	۲۱/۰۰±۱/۰۰ a	۱۲/۹±۳/۹ a	۲۵/۵±۲/۱۷ a
۳	۳	۱۷/۶۶±۰/۵۷ a	۲۴/۶۶±۰/۵۷ b	۱۲/۷۳±۱/۹۵ a	۲۰/۲±۱/۹۹ a
شاهد	۳	۱۰±۳/۱۱ a	۱۸/۰۰±۲/۷۸ a	۱۵/۴±۱/۵۷ a	۲۰/۵۶±۱/۹۱ a

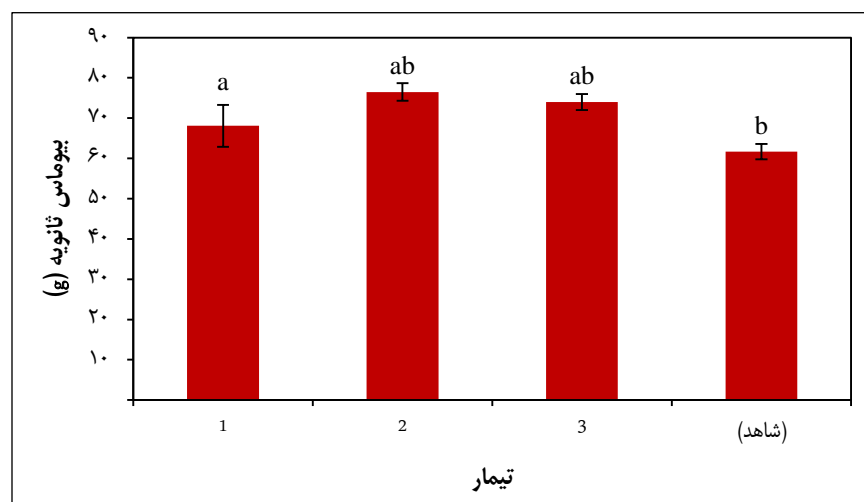
حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بر اساس آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از زی‌توده اولیه در تکرارها و تیمارها از توزیع نرمال برخوردار بودند و اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).



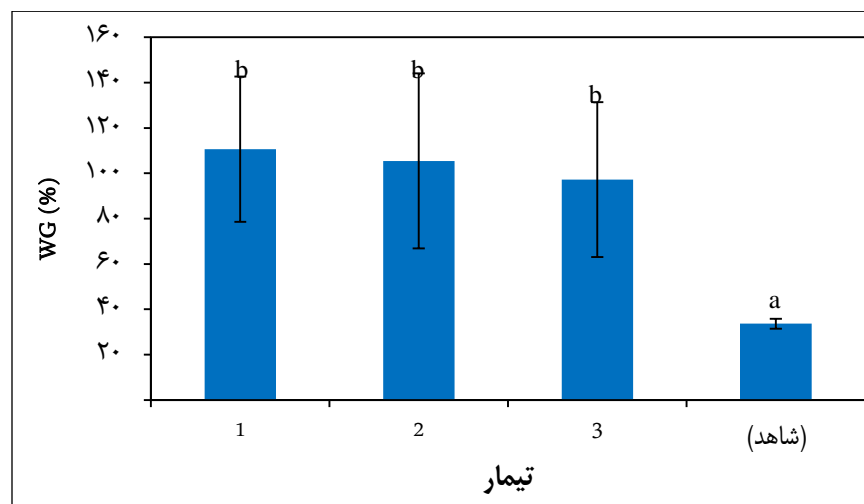
شکل ۱: مقایسه میانگین زی‌توده اولیه بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سیبری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

این در حالی است که بر اساس آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های حاصل از بیوماس نهایی در تکرارها و تیمارها از توزیع نرمال برخوردار بودند و بر اساس آزمون جداساز دانکن به‌منظور مقایسه میانگین بیوماس نهایی بچه تاس ماهیان سیبری بین تمامی تیمارها و تیمار شاهد در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که میزان بیوماس نهایی تیمار ۲ با میانگین  $61.53 \pm 7.65$  گرم بالاترین و تیمار شاهد با میانگین  $61.74 \pm 5.74$  گرم کمترین مقدار بیوماس نهایی بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۲ و ۳ مشاهده نشد و این در حالی است که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۱ و شاهد کاملاً مشهود بود (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه میانگین بیوماس اولیه بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سیبری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

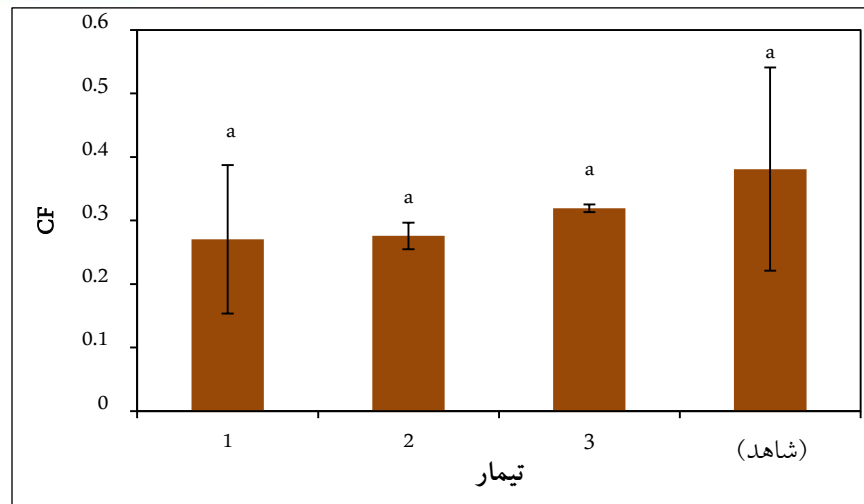
درصد افزایش وزن بچه تاس ماهیان سیبری در گروه‌های محتوی جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای یک تا ۳ در عین حال که تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها مشاهده نگردید. اما با تیمار شاهد (جیره غذایی فاقد پروبیوتیک) از اختلاف معنی‌داری برخوردار بودند ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه میانگین درصد افزایش وزن بدن بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سیبری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

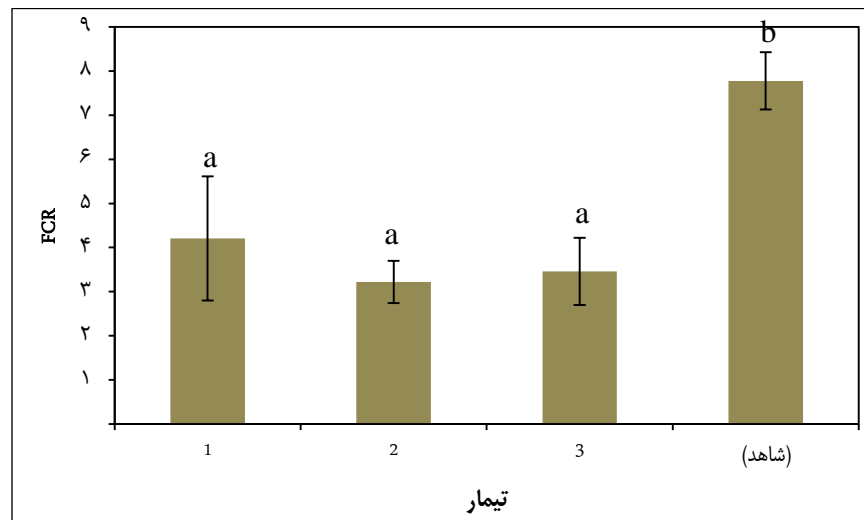
بر اساس آزمون جداساز دانکن به‌منظور مقایسه میانگین ضریب چاقی بچه تاس ماهیان سیبری بین تمامی تیمارها و تیمار شاهد در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). نتایج نشان داد که میزان ضریب چاقی در تیمارها از اختلاف کمی برخوردار بودند (شکل ۴).





شکل ۴: مقایسه میانگین ضریب چاقی بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سیبری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف همانم در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

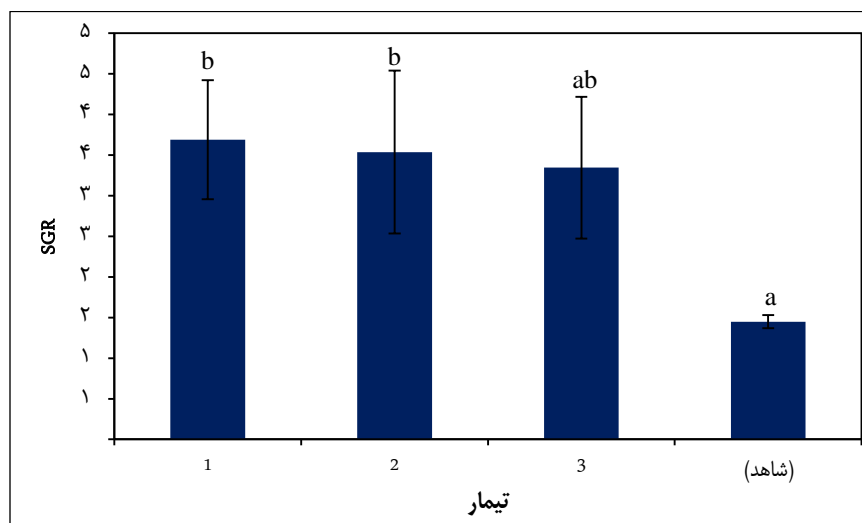
آزمون جداساز دانکن به‌منظور مقایسه میانگین ضریب تبدیل غذایی بچه تاس ماهیان سیبری بین تمامی تیمارها و تیمار شاهد در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد کمتر و غذا عملکرد بهتری داشته است. این در حالی است که ضریب تبدیل غذایی در بین تیمارهای به جزء شاهد از اختلاف معنی‌دار برخوردار نبودند (شکل ۵).



شکل ۵: مقایسه میانگین ضریب تبدیل غذایی بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سیبری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف غیر همانم در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

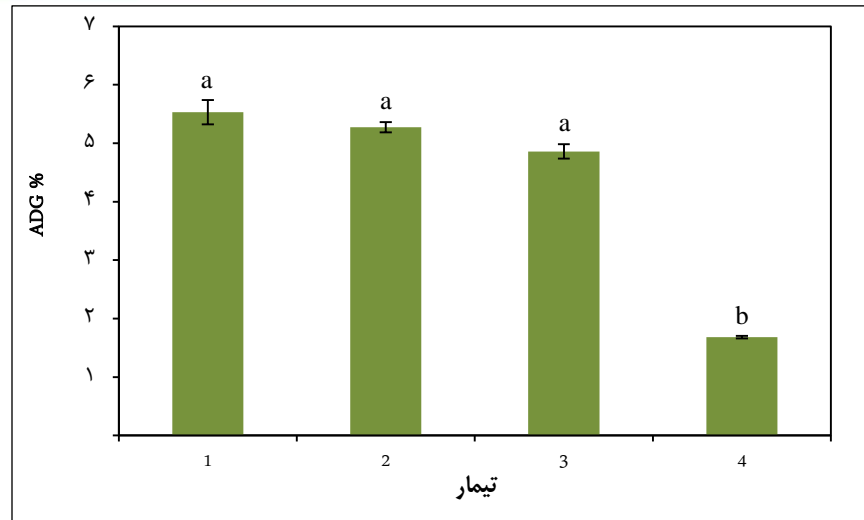
مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی ... / فرزانه و همکاران

آزمون جداساز دانکن به‌منظور مقایسه میانگین ضریب رشد ویژه (SGR) بچه تاس ماهیان سیبری نشان داد که بین تمامی تیمارها و تیمار شاهد در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). نتایج همچنین نشان داد که میزان SGR در تیمارهای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک به‌ویژه تیمارهای ۱ و ۲ (جیره‌های غنی‌سازی شده با میزان پروبیوتیک کمتر) نسبت به گروه شاهد از برتری معنی‌داری برخوردار بودند. کمترین میزان SGR در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۶).



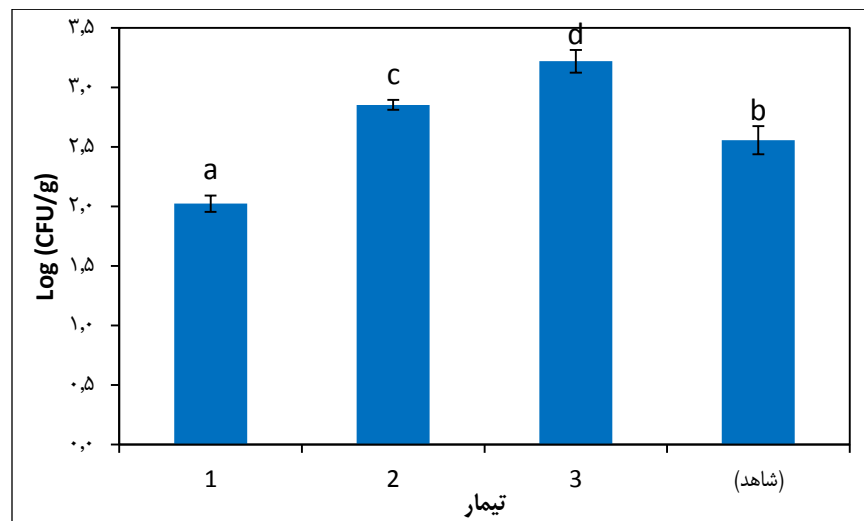
شکل ۶: مقایسه میانگین نرخ رشد ویژه بچه تاس ماهیان سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

همچنین نتایج نشان داد که متوسط رشد روزانه (ADG) در تیمارهای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد از افزایش معنی‌داری برخوردار بودند ( $P < 0/05$ ). کمترین میزان ADG در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۷). نتایج حاصل از بازماندگی بچه تاس ماهیان سیبری نشان داد که در همه تیمارها میزان بازماندگی ۱۰۰ درصد بود.



شکل ۷: مقایسه میانگین رشد روزانه ویژه بچه تاس ماهیان (*Acipenser baerii*) سبیری تغذیه‌شده با کرم‌های نرئیس غنی‌سازی شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک در تیمارهای مختلف. حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

طبق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه مقدار کل باکتری‌های موجود در کرم‌های نرئیس غنی‌شده با پروبیوتیک بر محیط کشت MRS بین همه تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بر اساس آزمون دانکن مقدار کل باکتری‌های تیمارها در کرم نرئیس روند افزایشی داشته است و در تیمار شاهد از کمترین میزان برخوردار بود و بین تیمارها با شاهد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (شکل ۸).

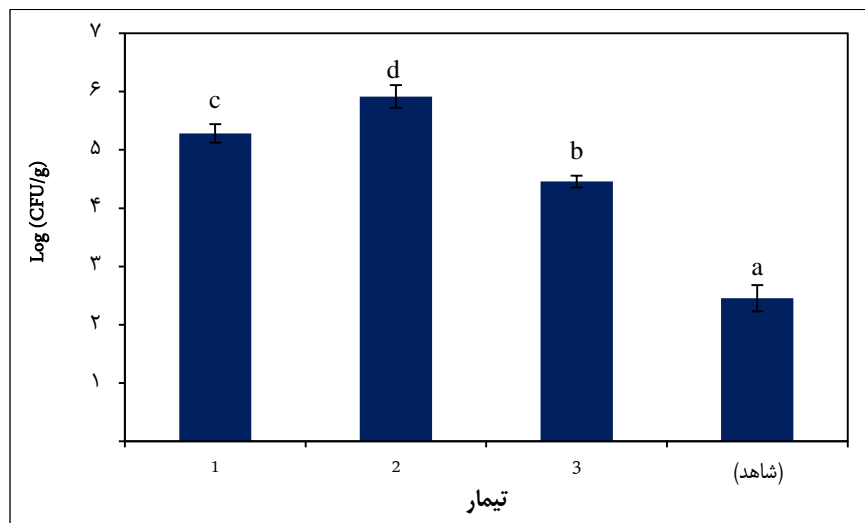


شکل ۸: مقایسه میانگین مقدار کل باکتری‌های کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد

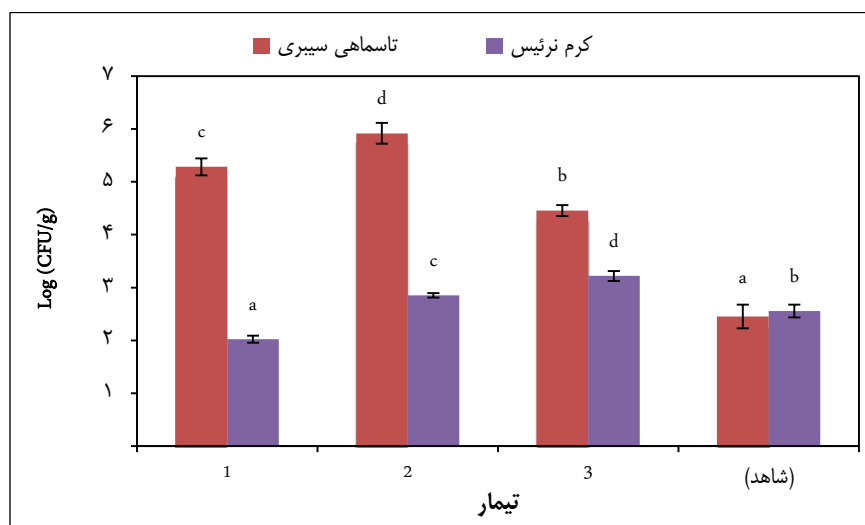
طبق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه مقدار کل باکتری‌های موجود در روده بچه تاس ماهی سبیری غنی‌شده با پروبیوتیک روی محیط کشت MRS بین همه تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بر اساس آزمون دانکن مقدار کل باکتری‌های تیمارها روند افزایشی نداشته

مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی ... / فرزانه و همکاران

است. به طوری که، مقدار کل باکتری‌های موجود در تیمار ۲ از تیمار ۳ بیشتر بود و در تیمار شاهد از کمترین میزان برخوردار گردید و بین تیمارها با شاهد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). نتایج حاصل از مقایسه میانگین مقدار کل باکتری‌های موجود در روده تاس ماهی سیبری با کرم نرئیس نشان داد که میزان آن در روده بچه تاس ماهیان سیبری بیشتر از کرم نرئیس بود. همچنین نتایج نشان داد مقدار کل باکتری‌های شمارش‌شده در کرم نرئیس در تیمار ۳ بیشتر از سایر تیمارها بود و این در حالی است که مقدار کل باکتری‌ها در روده بچه تاس ماهی سیبری در تیمار ۲ بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل‌های ۹ و ۱۰).



شکل ۹: مقایسه میانگین مقدار کل باکتری‌های موجود در روده تاس ماهی (*Acipenser baerii*) سیبری با تیمار شاهد. حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱۰: مقایسه میانگین مقدار کل باکتری‌های موجود در روده تاس ماهی (*Acipenser baerii*) سیبری و کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*). حروف غیر همنام در ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

چندین روش برای استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری وجود دارد و در پرورش لارو آبزیان، به‌ویژه اگر هدف استفاده از پروبیوتیک، بهبود رشد و شرایط تغذیه باشد بهترین مسیر برای رساندن باکتری‌های پروبیوتیکی به لارو آبزیان از طریق غذای زنده است. این مسئله که بتوان روده لارو آبزیان را با استفاده از باکتری‌های مفید از زمانی که تغذیه خارجی آن‌ها شروع می‌شود تلقیح و کلونی‌سازی نمود، دارای مزیت زیادی است زیرا جوامع پیشگام باکتریایی که روده را در مراحل اولیه کلونی‌سازی می‌نمایند در مقایسه با سایر باکتری‌ها که در مراحل بعد وارد می‌شوند دارای یک مزیت رقابتی هستند (Hansen and Olafsen, 1999). بر همین اساس باید آزمایش‌هایی را انجام داد تا مطمئن شد که در فرآیند غنی‌سازی انواع غذای زنده با پروبیوتیک‌ها به میزان کافی باکتری جذب این نوع غذاها خواهد شد تا در هنگام تغذیه لاروها، این باکتری‌ها در دستگاه گوارش آن‌ها جایگزین شوند. در این بین کرم نرئیس زنده احتمالاً پتانسیل خوبی برای این هدف دارد، زیرا می‌تواند از باکتری‌ها تغذیه نموده و حتی مانند آرتمیا از طریق فیلتر نمودن آب پروبیوتیک را جذب نماید و به‌عنوان حامل جهت رساندن باکتری‌های پروبیوتیکی به مراحل لاروی جانوران آبی یا تلقیح دستگاه گوارش با این باکتری‌ها به‌کاربرده شود.

تاکنون غنی‌سازی کرم نرئیس با باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس در ایران صورت نگرفته است. جعفریان و همکاران (۱۳۸۶)، اثرات مثبت استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی غنی‌شده با *Artemia urmiana* را بر رشد و بقای لاروهای تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بررسی نمودند.

در تحقیق حاضر کرم نرئیس به‌عنوان یک حامل انتقال پروبیوتیک گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس به دستگاه گوارش بچه تاس ماهی سیبری، برای افزایش معیارهای رشد از طریق ارتقاء کیفیت فلور میکروبی روده آن بکار برده شد. در این تحقیق مقدار کل باکتری‌های موجود در کرم نرئیس غنی‌شده با پروبیوتیک بر محیط کشت MRS بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بوده که این میزان در تمام تیمارها روند افزایشی داشت و در تیمار شاهد از کمترین میزان برخوردار بود که در نهایت با توجه به هدف این تحقیق جهت انتقال بیشترین میزان باکتری پروبیوتیک به دستگاه گوارش بچه تاس ماهی سیبری، به‌منظور ارتقای معیارهای رشد از طریق بهبود کیفیت فلور میکروبی روده تیمار ۳ از بالاترین کارایی برخوردار بود.

گزارش‌های متعددی نیز در زمینه استفاده موفقیت‌آمیز از آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک‌ها در زمینه پرورش لاروی آبزیان منتشر شده است (Garcia-de-la-Banda, et al., 1992, Rengpipat et al., 2000, Makridis et al., 2001, Gatesoupe, 2002, Ziaei-Nejad et al., 2006). نکته مهم آن است که از این طریق می‌توان به‌خوبی دستگاه گوارش لارو آبزیان را با باکتری‌های مفید کلونی‌سازی نمود و تعادل میکروبی آن و در نتیجه رشد و بازماندگی را بهبود بخشید. در تحقیقی که تغذیه لاروهای میگوی ببری سیاه با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus S11* سبب شد که زمان تکامل لاروی کوتاه‌تر شده و بازماندگی آن‌ها افزایش یابد (Rengpipat et al., 2003). به‌طور مشابهی، Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۶) بعد از تغذیه لاروهای میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus spp.* بازماندگی بالاتر و فعالیت بیشتر آنزیم‌های گوارشی را مشاهده نمودند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پروبیوتیک موردبررسی دارای توانایی خوبی جهت اتصال به کرم نرئیس هستند. بیشترین تعداد باکتری متصل شده به کرم نرئیس برای باکتری‌های گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس در تیماری که حاوی  $10^7$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم باکتری بود، مشاهده شد و بیشترین تعداد باکتری متصل شده به کرم نرئیس معادل  $1/7 \times 10^3$  عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم اندازه‌گیری شد. این نتایج مشابه آن چیزی است که Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸) در غنی‌سازی آرتمیا با استفاده از پروبیوتیک به دست آوردند. هرچند این محققین تراکم بالاتری از باکتری را در محیط غنی‌سازی استفاده نمودند ( $10^8$  سلول در میلی‌لیتر)، اما بیشترین تعداد باکتری متصل شده به آرتمیا را عدد کلنی تشکیل‌شده در آرتمیا  $4/55 \times 10^3$  گزارش دادند.

مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی ... / فرزانه و همکاران

نوع باکتری تأثیر مهمی در پتانسیل اتصال باکتری‌ها دارد. هرچند به نظر می‌رسد ساختار و شرایط سطحی که باکتری باید به آن متصل شود نیز در فرایند اتصال تأثیرگذار می‌باشد. Vine و همکاران (۲۰۰۶)، بیان نمودند که اتصال باکتری به موجودات غذایی زنده تحت تأثیر عواملی مانند فلور میکروبی موجود در غذای زنده، روش آماده‌سازی و مرحله متابولیسمی باکتری موردنظر (شرایط محیط غنی‌سازی) می‌باشد.

در مرحله دوم تحقیق حاضر پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش باعث بهینه‌سازی جمعیت میکروبی بچه تاس ماهی سبیری شدند. همچنین با توجه به اینکه تمامی لاروهای مورد استفاده از یک مولد تأمین گشت مقایسه میانگین وزن و طول لاروها بین گروه تیمار و شاهد در بیومتری آغازین جهت تیمار بندی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. تلقیح پروبیوتیکی به دستگاه گوارشی بچه تاس ماهی سبیری از طریق کرم نرئیس غنی‌شده با باکتری‌های گروه پروبیوتیکی باسیلوس و لاکتوباسیلوس سبب افزایش عدد کلنی تشکیل شده در گرم این باکتری در کرم نرئیس و در نتیجه در روده ماهی شده و مقدار آن‌ها به موازات هم افزایش یافت به طوری که، تأثیرات تعداد کلنی تشکیل شده آن‌ها بر معیارهای رشد مشهود بود. همچنین در انتهای دوره آزمایش، وزن کل در تیمارهای آزمایشی روندی صعودی داشت، و با میانگین  $25/5 \pm 2/17$  گرم در تیمارهای آزمایشی بیشتر از گروه شاهد با میانگین  $20/56 \pm 1/91$  گرم بود. در نتیجه می‌توان گفت که پروبیوتیک با بهبود شرایط هضم و جذب، موجب افزایش کارایی تغذیه و در نتیجه رشد بچه تاس ماهی سبیری شده است. چنین پدیده مثبتی در کاربرد باسیلوس‌های پروبیوتیکی غنی‌شده با ناپلی آرتیمیا ارومیا نا به منظور رشد و بقاء لاروهای تاس ماهی ایرانی نیز به دست آمده است (جعفریان و همکاران، ۱۳۸۶).

همچنین میانگین زنده‌مانی بچه تاس ماهیان سبیری بین گروه تیمار و شاهد در بیومتری نهایی صد در صد بود که می‌توان بیان کرد که این میزان زنده‌مانی در بین بچه تاس ماهیان به سه دلیل می‌تواند باشد اول اینکه بچه تاس ماهیان در مقایسه با لاروها به دلیل افزایش کارایی سیستم آنزیمی معده آن‌ها از بقاء بالاتری برخوردارند. دوم اینکه بچه تاس ماهیان از غذای زنده که در بقاء تأثیر دارند، استفاده می‌کنند و سوم اینکه غنی‌سازی غذای زنده این موضوع را چند برابر می‌کند. این موضوع در خصوص هضم و جذب غذا توسط پروبیوتیک‌ها که تأثیرات مثبتی بر بقاء ماهیان دارند، توسط Gatesoupe در سال ۱۹۹۹ نیز مورد تأیید قرار گرفته است.

در بچه تاس ماهیان سبیری تغذیه‌شده با کرم نرئیس حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی، ضریب تبدیل غذا به میزان قابل توجهی کاهش یافت که نظیر همین نتایج را Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ در پرورش ماهی روهو با استفاده از تغذیه از آرتیمیای غنی‌سازی شده با *Bacillus circulans* به دست آمده آوردند. به طوری که، *Bacillus circulans* ایزوله شده از روده ماهی روهو در غلظت‌های مختلف باعث کاهش ضریب تبدیل غذا در این ماهی شد. باکتری‌های پروبیوتیکی بکار گرفته شده در تحقیق حاضر توانستند به موازات قابل توجهی بر دیگر معیارهای رشد تأثیر مثبت گذارده و عملکرد رشد را بهبود بخشند. هرچند که در برخی فاکتورهای رشد اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نداشتند. مطالعات صورت گرفته مبین این موضوع است که این میکروارگانیسم‌ها در روده تاس ماهی سبیری مورد مطالعه، از طریق ترشح مواد خارج سلولی نظیر آنزیم‌های گوارشی باعث هضم و جذب بهتر غذا در روده ماهی می‌گردند. Gatesoupe و همکاران (۱۹۹۹) بیان نمودند که برخی پروبیوتیک‌ها اشتها را افزایش می‌دهند و افزایش کلی را در فاکتورهای رشد، از جمله وزن به وجود می‌آورند. جعفریان و همکاران (۱۳۸۶)، نشان دادند که استفاده از آرد *Daphnia magna* مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی، تأثیر بسیار زیادی بر کارایی تغذیه و رشد لاروهای ماهیان قزل-آلا دارد. آذری تاکامی و همکاران (۱۳۸۴)، نشان دادند که رشد و نرخ بقاء میگوی سفید هندی تحت تأثیر باسیلوس‌های زیست‌یار از  $71/5$  درصد در گروه شاهد به  $88/35$  درصد در تیمارهای حاوی باکتری ارتقاء یافت. شاخص وضعیت به‌عنوان یکی از شاخص‌های سلامتی که منعکس‌کننده شرایط تغذیه‌ای ماهی است، به کار می‌رود. در تحقیق حاضر شاخص وضعیت در تیمار تغذیه‌شده با کرم نرئیس غنی‌شده اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت و حتی ماهیان تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها از شاخص وضعیت بالاتری برخوردار بودند.

درصد افزایش وزن در تیمارهای تغذیه‌شده با کرم نرئیس غنی‌سازی شده با پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود. به طوری که، حداکثر درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه، در تیمارهای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک مشاهده شد و حداقل میزان این دو فاکتور نیز در گروه شاهد

مشاهده شد. علت این امر را می‌توان به عملکرد باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس نسبت داد که با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی، باعث هضم بهتر و در نتیجه رشد بهتر می‌گردند و این نتیجه با نتایج Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطابقت دارد.

بیشترین ضریب رشد ویژه در تیمارهای ۱ و ۲ نسبت به شاهد مشاهده گردید. چنانچه تغذیه با پروبیوتیک صورت گیرد، نتایج بهتری حاصل می‌شود. این یافته‌ها با نتایج به‌دست‌آمده از برخی محققان نیز مطابقت دارد. به‌طوری‌که Gullian و همکاران (۲۰۰۴) در میگوئی وانامی (P. vannemie) از پروبیوتیک *Bacillus P64*، *Vibrio P62* و *V. alginolyticus* استفاده نمودند و ضریب رشد بالاتری را در تیمارهایی که پروبیوتیک به غذایشان اضافه‌شده بود، مشاهده نمودند. همچنین Khattab و همکاران (۲۰۰۵) هم با استفاده از پروبیوتیک *Microoccus luteus* در ماهی تیلاپیا، ضریب رشد ویژه بالاتری را مشاهده نمودند. در این بررسی با توجه به اینکه دمای مناسب (در محدوده ۲۳/۴-۲۱/۷ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول آب (۷/۲-۵ میلی‌گرم در لیتر) و pH (۸/۳-۶/۶) برای پرورش بچه تاس ماهی‌سبیری وجود داشت. بنابراین، فاکتورهای رشد نیز تحت تأثیر این فاکتورهای محیطی قرار گرفت (Wache et al., 2006)، و از طرف دیگر دما تأثیر زیادی بر فعالیت پروبیوتیک‌های باکتری‌ها دارند (Gatesoupe et al., 2005). همچنین پروبیوتیک به‌عنوان یک محرک رشد در این آزمایش استفاده شد، از این‌رو نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش می‌تواند برای بخش‌های اجرایی توصیه گردد چراکه در شرایط مساعد محیطی نتایج بهتری حاصل می‌گردد. آنچه از نتایج این تحقیق برمی‌آید این است باکتری‌های گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس مورد آزمایش توانایی خوبی برای اتصال به کرم نرئیس دارند. این توانایی بخشی به بیولوژی سلول‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس و بخشی به طبیعت فیلتر کنندگی کرم نرئیس به‌عنوان یک غذای زنده برمی‌گردد. لذا، این امکان میسر است که از کرم نرئیس به‌عنوان حامل این پروبیوتیک‌ها و رسانش آن‌ها به لارو آبزیان که هدف بسیاری از مطالعات در این زمینه هستند، بهره برد. این شرایط می‌تواند برای پرورش دهندگان نیز بسیار کاربردی باشد. پرورش‌دهندگان مخصوصاً پرورش‌دهندگان میگو و ماهیان دریایی، معمولاً جهت استفاده و رساندن پروبیوتیک‌ها به لاروها و بچه ماهیان دچار مشکل می‌باشند. نتایج این تحقیق احتمالاً خواهد توانست راهگشای بخش خصوصی تکثیر و پرورش تاس ماهیان، ماهیان دریایی و میگو باشد.

در نتیجه گیری کلی این تحقیق می‌توان بیان نمود که احتمالاً استفاده از کرم نرئیس غنی‌سازی شده با پروبیوتیک به میزان ۱۰<sup>۶</sup> عدد کلنی تشکیل‌شده در گرم توانستیم هم از کرم نرئیس به‌عنوان غذای زنده باکیفیتی مطلوب و هم به‌عنوان حامل پروبیوتیک‌های گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس به دستگاه گوارش بچه تاس ماهیان سبیری استفاده دوجانبه نماییم. پروبیوتیک گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس منتقل شده به روده بچه تاس ماهیان سبیری اثر مثبتی بر فاکتورهای رشد و بهبود فلور باکتریایی روده دارد به‌طوری‌که، با توجه به قدرت چسبندگی پروبیوتیک گروه باسیلوس و لاکتوباسیلوس به غذا، افزایش فاکتورهای رشد، کاهش ضریب تبدیل غذایی و پرشمار شدن باکتری‌های مفید روده را به دنبال داشت.

## منابع

- آذری تاکامی، ق.، مشکینی، س.، رسولی، ع. و امینی، ف.، ۱۳۸۴. بررسی اثرات تغذیه‌ای ناپلیوس‌های *Artemia urmiana* غنی‌شده با ویتامین C روی رشد، بقا و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان. فصلنامه پژوهش و سازندگی، شماره ۶۶، بهار، صفحات ۳۲-۲۵.
- پژند، ذ.، حدادی مقدم، ک.، چوبیان، ف.، روفچاهی، ر. و پرندآور، ح.، ۱۳۸۸. بررسی تأثیر دما، شوری و دوره نوری در القا رسیدگی جنسی و رفتارهای تولیدمثلی کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*). مجله علمی شیلات ایران، ۱۸(۳)، صفحات ۲۰-۱۱.
- جعفریان، ح.، آذری تاکامی، ق.، کمالی، الف.، سلطانی، م. و حبیبی رضایی، م.، ۱۳۸۶. استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی غنی‌شده با ناپلی آرتمیا ارومیا به‌منظور رشد و بقا لاروهای تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۴(۲)، صفحات ۸۷-۷۷.
- حسینی‌فر، س.ح. و پورامینی، م.، ۱۳۸۶. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. چاپ اول. تهران، انتشارات موج سبز، ۱۲۰ ص.

مطالعه اثرات استفاده از کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*) غنی‌سازی شده با باکتری‌های پروبیوتیکی ... / فرزانه و همکاران

قشقایی، ر. و لایق، و.، ۱۳۸۳. پروبیوتیک‌ها (تکنولوژی نوین در آبی‌پروری). انتشارات نقش مهر، تهران، ۸۳ ص.  
 کامکار، م.، قانع، م.، پورغلام، ر. و قیاسی، م.، ۱۳۹۰. بررسی تأثیر باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) به‌عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قرل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به دنبال عفونت تجربی با استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*). دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران. صفحه ۱۳.  
 محسنی، م.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی، ر.، علیزاده، م.، ۱۳۸۵. گزارش نهایی پروژه تعیین احتیاجات غذایی فیل‌ماهی از مرحله لاروی تا مرحله عرضه به بازار. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، ۲۲۴ ص.

**Chung, M. Y., Liu, C. H., Chen, Y. N. and Cheng, W., 2011.** Enhancing the reproductive performance of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by incorporating sodium alginate in the broodstock and larval diets. *Aquaculture*, 312(1), 180-184.

**Doyle, C., Jason, E. and Brian McMahan, R., 1995.** Effects of acid exposure in the brine shrimp, *Artemia franciscana* during development in seawater. *Comparative Biochemistry and physiology, Part A: Physiology*, 112 (1):123 – 129.

**Fuller, R., 1989.** Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5): 365-378.

**Gatesoupe, F. J., 1999.** Review: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2): 147-165.

**Gatesoupe, F. J., 2002.** Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212(1-2): 347-360.

**Gatesoupe, F. J., Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. and Quazuguel, P., 2005.** Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture*, 158(1-2): 117-127.

**Ghosh, K., Sen, S. K. and Ray, A. K., 2002.** Growth and survival of Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. *Acta Ichthyologica Piscatoria*, 32(1): 83-92.

**Garcia de la Bande, I., Chereguini, O. and Rasines, I., 1992.** Influence of lactic bacterial additives on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae culture. *Boletin - Instituto Espanol de Oceanografia*, 8(2): 247-254.

**Gomez-Gil, B., Herrera-Vega M. A., Abreu-Grobois F. A., Roque A., 1998.** Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6): 2318-2322.

**Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J., 2004.** Selection of Probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1-4): 1-14.

**Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T., 2004.** Diversity and seasonal changes in *lactic acid* bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234(1): 335-346.

**Hansen, G. H. and Olafsen, J. A., 1999.** Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbiological Ecology*. 38(1): 1-26.

**Khattab, Y. A. E., Shalaby, A. M. E., Abdel-Rhman, A. A., 2005.** Use of probiotic bacteria as growth promoters, anti-bacterial and their effects on physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 28(1-2): 74-81.

**Kissil, G. W. M., Lupatsch, I., Elizur, A. and Zohar, Y., 2001.** Long photoperiod delayed and increased somatic growth in Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 200(3-4): 363-379.

**Makridis, P., Bergh, Q., Skjermo, J. and Vadstein, O., 2001.** Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia* metanauplii to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International*, 9(3): 225-235.

**Marzouk, M., Moustafa, M., Nermeen, M. and Mohamed, M., 2008.** The influence of some probiotics on the growth performance and intestinal microbial flora of *O. Niloticus*. *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 1059-1071.

**Nomoto, K., 2005.** Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6): 583-592.



- Olive, P. J. W., 1999.** Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism. *Hydrobiologia*, 402(0): 175-183.
- Pollock, D. D., Zwickl, D. J., McGuie, J. A., Hillis, D. M., 2002.** Increased Taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Systematic Biology*, 51(4): 664-671.
- Rengpipat, S., Pukpratanporn, S., Piyatitivorakul, S. and Menasaveta, P., 2000.** Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191(4): 271-288.
- Rengpipat, S., Tunyamum, A., Fast, A. W., Piyatiratitivoraku, S. and Menasaveta, P., 2003.** Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic organisms*, 55(2): 169-173.
- Ringo, E., Schillingerb, U. and Holzapfelb, W., 2005.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. *Biology of Growing Animals*, 2: 418-453.
- Vine, N. G., Leukes, W. D. and Kaiser, H., 2006.** Probiotics in marine larviculture. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, 30(3): 404-427.
- Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L. and Quentel, C., 2006.** Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* fry. *Aquaculture*, 258(1-4): 470-478
- Ziaei-Nejad, S., Habibi-Rezaei, M., Azari-Takami G., Lovett, D. L, Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2-4): 516-524.