Archive of SID

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۴۹-۳۹

تأثیر مکملهای پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* و *Saccharomyces cerevisiae* بر پارامترهای زیستی *Artemia franciscana* در کشتهای انبوه

وحید رضایی امینلویی[۱]، نصراله احمدی فرد*[۲]، امیر توکمه چی[۳]، ناصر آق[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. دانشیار گروه آرتمیا، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۶

چکیده

پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای مفیدی هستند که در دستگاه گوارش موجودات به‌صورت کلونی درآمده و اثرات مفیدی بر سلامت و رشد موجود میزبان دارند. در تحقیق حاضر اثر پروبیوتیکهای *Bacillus subtilis* و *Saccharomyces cerevisiae* بر پارامترهای رشد، بازماندگی، ترکیب لاشه، و مقاومت *Artemia franciscana* در مقابل باکتری بیماریزای *Vibrio campbellii* مورد بررسی قرار گرفت. باکتری *Bacillus subtilis* با تراکم ۱×۱۰^{۵} CFU به ازای هر میلی لیتر آب به محیط پرورش آرتمیا اضافه شد و بر مبنای وزنی باکتری از مخمر استفاده شد. آزمایش بصورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار: تیمار۱ به عنوان شاهد (فاقد پروبیوتیک)، تیمار دو (غذا + باکتری)، تیمار سه (غذا + مخمر) و تیمار چهار (غذا به همراه مقدار برابری از مخمر و باکتری) انجام گرفت. در روز ۸ و ۱۵ آزمایش طول و بازماندگی آرتمیا محاسبه گردید. در انتهای آزمایش (روز ۱۵)، آرتمیا با باکتری بیماری زای *V. campbellii* مواجهه شد. بر اساس نتایج، حداکثر اندازه بدن بطور معنی‌داری در تیمار ۲ مشاهده گردید که با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین حداکثر بازماندگی در تیمار۲ و ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نداشت ($P > ۰/۰۵$). بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با باکتری ویبریو، بیشترین و کمترین درصد بازماندگی به ترتیب در تیمار چهار و تیمار کنترل (فاقد پروبیوتیک) مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$). ترکیبات لاشه نیز بطور معنی داری تحت تأثیر پروبیوتیکهای مورد استفاده بود به نحوی که حداکثر میزان خاکستر در تیمار ۳ مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$). بیشترین مقدار پروتئین و میزان چربی به ترتیب مربوط به تیمار شاهد و تیمار ۴ بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت ($P < ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک می تواند تأثیر مثبتی بر رشد و بازماندگی *A. franciscana* در مقابله با باکتری بیماریزا *Vibrio campbellii* داشته باشد و استفاده از پروبیوتیک برای جلوگیری از مرگ و میر ناشی از این باکتری در کشت آرتمیا اثرات سودمندی خواهد داشت.

واژگان کلیدی: آرتمیا ، پروبیوتیک، مخمر، باکتری، شاخصهای زیستی

* نویسنده مسئول مکاتبه

Email: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

یکی از مهمترین گونه‌های آرتمیا در جهان، گونهٔ *Artemia franciscana* می‌باشد. این آرتمیا با توجه به درصد تفریخ بالا و درصد خلوص سیستها، همزمانی تفریخ، اندازه مناسب، ارزش غذایی بالا، قیمت و تقاضای جهانی بالایی دارد (Lavens and sorgeoos, 1996). آرتمیا به عنوان یک غذای عالی برای (تفریخگاهها) مخصوصا لاروهای تازه هچ شده ماهی می‌باشد بنابراین با توجه به اهمیت این موضوع آبزی پروری در دهه ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ توسعه بسیاری داشت (Bengtson *et al.*, 1991). آرتمیا یکی از مهم‌ترین غذاهای زنده در آبزی پروری می‌باشد که با داشتن ویژگیهایی مانند پرورش آسان، قابلیت دسترسی و نگه‌داری آن به مدت طولانی و قابلیت حمل انواع ویتامینها، آنتی‌بیوتیکها و واکسنها به صورت گسترده‌ای در آبزی‌پروری نقش دارند (Sorgeloos *et al.*, 1986). مطالعات زیادی در زمینهٔ اثرات باکتریهای گوناگون بر شاخصهای زیستی *A. franciscana* انجام شده است (Orozco – medina Verschuere *et al.*, 1999; *et al.*, 2002; Marques *et a*l., 2006). امروزه آرتمیا به عنوان یکی از بهترین غذاهای زنده برای پرورش لارو سخت‌پوستان، ماهیان دریایی، ماهیان آب شیرین و زینتی شناخته شده است. آرتمیا موجودی است که می توان آن را با توجه به نیاز آبزی پروری در مراحل مختلف چرخهٔ زیستی آن مورد استفاده قرار داد. آرتمیا از نظر تغذیه‌ای، فیلتر کننده غیر انتخابی است، بدین معنا که از کلیه مواد غذایی موجود در محیط که از نظر اندازه قابلیت ورود به دهان را داشته باشند، میتواند تغذیه نماید (Hafezieh, 2004).

در سالهای گذشته، به منظور بهبود سلامت و افزایش تولید، راههای جایگزین درمان، نظیر استفاده از پروبیوتیکها در جیره غذایی پیشنهاد شده است. استفاده از مکملهای غذایی به منظور افزایش تولید و مقاومت در برابر بیماری طی چند سال اخیر به یک بخش مهم و جدایی ناپذیر در صنعت آبزی پروری تبدیل شده است (Ahmadvand *et al.*, 2012). با توجه به موفقیتهای اخیر حاصل از این روش جایگزین، سازمان فائو استفاده از این مکملها را به عنوان موارد عمدهٔ تحقیقات آینده جهت بهبود بازماندگی، کنترل و کاهش بیماری و بهبود کیفیت محیط زیست آبزیان در آبزی پروری پیشنهاد نموده است (FAO, 2010).

بیماریها به عنوان یکی از مهمترین مشکلات در تولیدات آبزی‌پروری مطرح هستند. در سیستمهای پرورش متراکم آبزیان خصوصاً در مراحل لاروی اغلب در معرض شرایط استرس زا هستند که در نهایت منجر به عفونتهای میکروبی می‌شود (Cavalier-Smith, 2003). برای حفاظت آبزیان در مقابل بسیاری از بیماریها عملیاتهای معمول مانند ضدعفونی آب قبل از کاربرد آن و همچنین استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیکها انجام می شود (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 نمی باشد (Cavalier-Smith, 2003).

پروبیوتیکها میکرو ارگانیزمها یا موادی هستند که در تعادل میکروبی روده‌ی میزبان نقش دارند (Parker, 1974). پروبیوتیکها نقش مهمی در پیشگیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماریزا، ارتقاء عملکرد رشد، افزایش بازماندگی در دوره‌ی لاروی، افزایش ایمنی و بهبود تحمل به تنش در آبزیان ایفا می‌کنند که در تحقیقات بیشماری توسط محققان شیلاتی تایید شده است (Gatesoupe, 1999; Balcazer *et al.*, 2006; Merrifield *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). پروبیوتیک می‌تواند به عنوان مکمل غذایی، مواد ضروری مثل ویتامینها، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب را برای موجود فراهم کند (Austin, 1988). علاوه بر این گمان می‌رود آنزیمهای باکتریایی یک نقش اساسی در شکستن اجزا غذایی بزرگ داشته و باعث جذب آسان این مواد بوسیله آرتمیا می شود. چنین فعالیت آنزیمی بوسیله آنزیمهای باکتریایی برای هضم جلبک بوسیله آرتمیا گزارش شده است (Intriago and Jones, 1993). همچنین وجود باکتریها در محیط پرورش می‌تواند باعث بهبود رشد در موجودات آبزی شود (Intriogo and Jones, 1993; Marques *et al.*, 2004).

www.SID.ir

Archive of SID

مخمر *Saccharomycies cerevisiae* پایهٔ بسیاری از پروبیوتیکها را تشکیل می دهد چون در ساختمان خود حاوی ترکیبات محرک سیستم ایمنی، بتاگلوکاگون، اسیدهای نوکلئیک و الیگوساکاریدهایی مانند مانان هستند (Ringo *et al*., 1998). تأثیرتأثیر مخمر *ساکارومایس سروزیه* بر افزایش باکتریهای اسید لاکتیک دستگاه گوارش میزبان که این باکتری ها بطور مستقیم مانع تکثیر پاتوژنهای فرصت طلب می شود و بطور غیر مستقیم با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، سیستم ایمنی را تحریک می کند (David *et al*., 1999; Mahious and Ollevier., 2005). این مخمر منبع غنی از آنزیمها، نوکلئوتیدهای آزاد، ویتامینهای گروه ب و آمینو اسیدها می‌باشند و باعث بهبود رشد در شرایط استرسی می شود (Hoseinifar *et al*., 2011). در این تحقیق از دو پروبیوتیک مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) و (*Bacillus subtilis*) به عنوان مکمل پروبیوتیکی با هدف بررسی رشد، بازماندگی، ترکیب لاشه، و همچنین مقاومت آرتمیا در مقابل باکتری بیماریزای *Vibrio campbellii* استفاده گردید.

۲. مواد و روشها

۱.۲. محل انجام آزمایش و پرورش آرتمیا

این تحقیق در پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه انجام گرفت. برای انجام این آزمایش از دوازده عدد زوگ ۲۵ لیتری با حجم آبگیری ۲۰ لیتر و تراکم ۴۰۰۰ ناپلی در هر لیتر طی پانزده روز دورهٔ پرورش استفاده شد.

سیست *آرتمیا فرانسیسکانا* از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه و طبق روش استاندارد Sorgeloos (1986) تفریخ شدند. در این روش از آب دریای استریل و فیلتر شده (FASW) با شوری ۳۳ گرم در لیتر، دمای ۲۸ °C، pH ۸-۸/۵، نور ۲۰۰۰ لوکس و اکسیژن ۲/۵-۲ میلی گرم در لیتر به عنوان شرایط استاندارد تخم گشایی انتخاب شد.

۲.۲. تهیه پروبیوتیک

پروبیوتیکهای مورد نظر شامل *Saccharomyces cerevisiae* و *Bacillus subtilis* از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه (استوک اولیه این پروبیوتیکها از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شده است) تهیه شدند. برای کشت باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و باکتری بیماری زای *Vibrio campbellii* (VC) از محیط کشت (TSB[1]) که محصول شرکت Merck آلمان بود استفاده شد. استوک اولیه باکتری بیماری زا توسط محققین پژوهشکده از کشور بلژیک تهیه شده است. پس از سرد شدن محیطهای کشت خارج شده از اتوکلاو، تمام کشتها در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری در محیطهای کشت اختصاصی صورت گرفت. تمامی عملیات در زیر هود لامینار انجام گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C در انکوباتور تکان دهنده قرار داده شد تا باکتریها رشد کنند (Soltanian *et al*., 2007). پس از ۲۴ ساعت، کلنیهای تشکیل شده شمارش و تعداد باکتریها در هر یک از سوسپانسیون باکتری بر حسب واحد کلنی (CFU) به ازاء هر میلی لیتر تعیین شدند (Gomez-Gill *et al*., 1998). جهت سنجش و تنظیم تراکم باکتریها از اسپکتروفتومتر دیجیتالی استفاده شد.

مخمر مورد نیاز در این آزمایش به صورت آماده از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه شد ولی به دلیل اینکه هضم دیواره سلولی مخمر برای آرتمیا مشکل می باشد لازم بود قبل از شروع کار تیمار شیمیایی روی مخمر صورت بگیرد تا قابلیت هضم پذیری را در آرتمیا بالا ببرد.

۳.۲. بهبود قابلیت هضم مخمر

برای انجام این درمان، ابتدا مخمرها در یک غلظت ۲۰۰ میلی گرم وزن مرطوب در هر میلی لیتر در یک محیط کشت استریل شامل Na_2EDTA (۰/۵ مولار) و تریس بافر (۸ pH و ۰/۲ مولار) محلول شدند. بعد از اضافه کردن ۲ مرکاپتواتانول ۰/۲ (v/v) مخمر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی

[1] Tryptic Soy Broth

www.SID.ir

Archive of SID

گراد انکوبه شدند. مخمر پیش تیمار شده، جمع آوری و با محیط کشت پروتوپلاستین شامل یک بافر فسفات- سیترات KH_2PO_4 0.08 M; Na_3citrate (۵،۸۰.016 M , pH) و کلرید پتاسیم (۰/۶ مولار) شستشو شدند. سرانجام سلولهای مخمر سه بار بوسیله آب دریا شسته شده و بوسیله فیلترهای ۰/۲ میکرومتر فیلتر گردیدند (Tukmechi *et al*., 2011).

۴.۲. غذادهی آرتمیا در زوگها

در این تحقیق از دو نوع غذا که شامل جلبک *Dunaliella tertiolecta* و سبوس گندم بود که به نسبت ۵ درصد جلبک و ۹۵ درصد سبوس گندم مورد استفاده قرار گرفت. غذادهی بر اساس جدول (Coutteau *et al*., 1990) انجام می‌گرفت. بدین ترتیب که ابتدا جلبک آماده شده و بر اساس تراکم ۱۸ میلیون در هر میلی لیتر در روزهای مختلف پرورش در اختیار آرتمیا قرار می گرفت. پودر سبوس گندم آماده شده نیز در آب با شوری ۳۵ گرم در لیتر و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد حل شده و بر اساس درصد وزنی در روز های مختلف پرورش در اختیار آرتمیا قرار گرفت.

باکتری *Bacillus subtilus* با تراکم ۱×۱۰^{۵} CFU/ml و معادل وزنی آن مخمر ۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر به آب محیط پرورش آرتمیا بر اساس تیمارهای مختلف به آب اضافه شد. در تیمار چهار که مقدار باکتری و مخمر بصورت ۵۰٪ بود نصف این مقدار برای هر کدام لحاظ گردید.

۵.۲. تخمین رشد و بازماندگی

در روزهای ۸ و ۱۵ بعد از شروع تغذیهٔ آرتمیاها با مکمل های پروبیوتیکی از آرتمیاها نمونه برداری و بیومتری انجام گرفت. برای این کار از هر زوگ ۱۰ نمونهٔ ۱۰ میلی لیتری برداشته و بعد از شمارش تعداد آرتمیاهای زنده میزان بقای هر تیمار در پایان روز مزبور مشخص شد. برای بیومتری، فاکتور طول کل بدن (طول بدن از سر تا انتهای بند شکمی) ملاک بود. نمونه ها بعد از تثبیت در محلول لوگول توسط میکروسکوپ مجهز به میکرومتر چشمی و لام مدرج اندازه‌گیری شده و نتایج از نظر آماری مورد مقایسه قرارگرفت، با توجه به محدودیت کاربرد میکروسکوپ در اندازه‌گیری طول آرتمیا در مراحل پایانی از دستگاه استریومیکروسکوپ جهت ترسیم و از دستگاه دیجیتالیزر جهت اندازه‌گیریها استفاده شد (Atashbar *et al*., 2012).

۶.۲. آنالیز ترکیب لاشهٔ آرتمیا

تعیین ترکیب تقریبی لاشه آرتمیا طبق روش AOAC (۱۹۹۰) انجام گرفت. رطوبت و ماده خشک لاشه به طور وزنی تعیین شد (Azewedo، 2004). ماده خشک به دست آمده سپس توسط دستگاه های مختلف مورد تجزیه قرار گرفت. برای اندازه گیری پروتئین خام از روش کجلدال استفاده و بعد از سنجش مقدار نیتروژن طبق فرمول زیر محاسبه شد:

درصد پروتئین = درصد نیتروژن × ۶/۲۵

چربی خام از طریق حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به روش سوکسوله و با دستگاه سوکسوله اتوماتیک انجام شد، و همچنین خاکستر نیز از طریق سوزاندن درکوره ۶۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت تعیین شد (Sorensen *et al*., 2005).

۷.۲. آزمایش مواجهه با باکتری بیماریزای *Vibrio campbellii*

برای انجام این آزمایش در روز ۱۵ پرورش، از هر زوگ تعداد ۲۰۰ قطعه آرتمیا برداشت شده و به زوگهای شیشه‌ای یک لیتری منتقل شدند هر تیمار در قالب سه تکرار طرح بندی شد. این تیمارها با باکتری *Vibrio campbellii* با تراکمی برابر با ۵×۱۰^{۶} cell/mL در مدت زمان سه روز مواجهه داده شدند (Marques *et al*., 2006). تغذیه به صورت روزانه (دو بار در روز و مثل تغذیه در دوران پرورشی) انجام گرفت. در کلیه آزمایشها تیمارهای مختلف با گروه شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای هر تیمار، درصد بازماندگی به‌طور روزانه تعیین شد. به این منظور، تعداد آرتمیاهای زنده و شناور قبل از تغذیه روزانه به طور دقیق شمارش و یادداشت شد.

آنالیز آماری داده ها توسط نرم افزار SPSS

www.SID.ir

Archive of SID

(نسخه ۲۱) انجام گردید. مقادیر مربوط به داده های درصدی، تبدیل شدند و از آنالیزتجزیهٔ واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد. تعیین اختلاف میانگین چنددامنه دانکن در سطح معنی داری ۰۵/ انجام شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام گرفت.

۳. نتایج

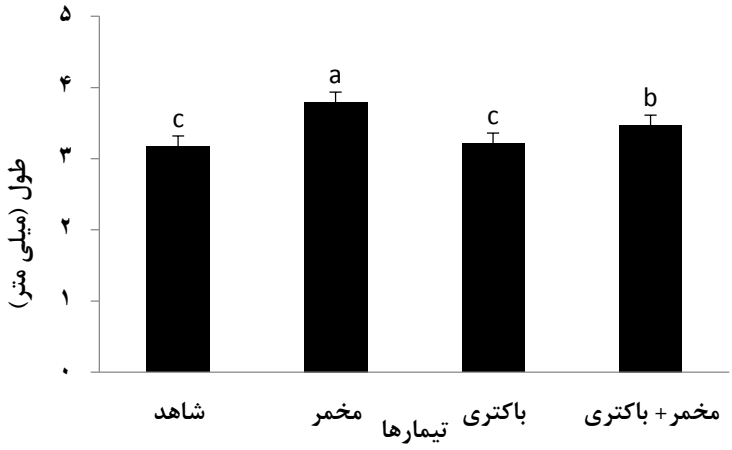
۱.۳. شاخص های رشد و بازماندگی

نتایج حاصل از تأثیر مکملهای پروبیوتیکی بر شاخص بازماندگی در طول دوره پرورش در جدول ۱ گزارش شده است. طبق نتایج بدست آمده بیشترین میزان بازماندگی در روزهای ۸ و ۱۵ مربوط به تیمار ۴ (۵۰٪ مخمر+ ۵۰٪ باسیلوس) بود که بطور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد و تیمار ۳ بود ($P < ۰/۰۵$). تیمار ۲ (تیمار مربوط به ۱۰۰٪ مخمر) با هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > ۰/۰۵$).

نتایج مربوط به شاخص طول در شکلهای ۱ و ۲ ارائه شده است. در روز ۸ و ۱۵ بیشترین میزان طول مربوط به تیمار۲ بود که با تیمار یک و سه اختلاف معنی دار داشت ($P < ۰/۰۵$). بطوریکه تیمار ۲ با میانگین (۵/۶۴ میلی متر) بیشترین و تیمار ۳ با میانگین (۵/۲۸ میلی متر) کمترین میزان را داشت.

جدول ۱- میانگین (± اشتباه معیار) میزان بازماندگی آرتمیاهای تغذیه شده با مکملهای پروبیوتیکی

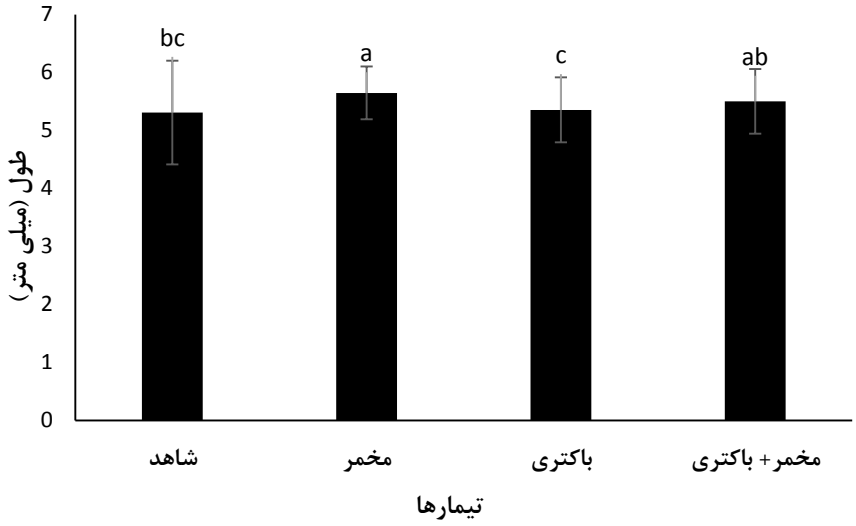
تیمارها	بازماندگی روز ۸ (بر حسب درصد)	بازماندگی روز ۱۵(بر حسب درصد)
تیمار شاهد	۶۲/۹۶±۱/۹۴b	۴۹/۹۳±۱/۳۵ b
تیمار۲	۶۴/۵۶±۲/۰۷ ab	۵۱/۷۵±۱/۸۴ ab
تیمار۳	۶۲/۵±۰/۵۳ b	۵۰/۲۸±۰/۷۹ b
تیمار۴	۶۸/۷۷±۱/۴۱ a	۵۹/۹۶±۱/۶۴ a



شکل ۱ - میانگین (± اشتباه معیار) طول آرتمیا فرانسیسکانا در تیمارهای مختلف در روز ۸ پرورش

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- میانگین (± اشتباه معیار) طول آرتمیا فرانسیسکانا در تیمارهای مختلف در روز ۱۵ پرورش

۲.۳. آزمایش مواجهه با *Vibrio campbellii*

نتایج حاصل از استفاده پروبیوتیکهای مخمر و باسیلوس به عنوان مکمل غذایی بر مقاومت در برابر عامل بیماریزای *ویبریو کمپلی* در جدول ۲ ارائه شده است. طبق نتایج بدست آمده بیشترین میزان بازماندگی بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت رویارویی با باکتری بیماریزای *Vibrio campbellii* مربوط به تیمار ۴ بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت ($P < ۰/۰۵$). بیشترین میزان مرگ و میر بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با باکتری *ویبریو کمپلی* در تیمار شاهد مشاهده شد (۷۲ ٪). کمترین میزان مرگ و میر هم در تیمار ۴ (تیمار مربوط به مخلوط مخمر و باکتری) مشاهده گردید (۱۴ ٪) که با تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشت ($P < ۰/۰۵$).

جدول۲- میانگین (± اشتباه معیار) درصد بازماندگی آرتمیا فرانسیسکانا پس از مواجهه با عامل بیماری زا ویبریو کمپلی در زمانهای مختلف

طول دوره مواجهه	تیمار۱	تیمار ۲	تیمار۳	تیمار۴	تیمارکنترل مثبت*
۲۴ ساعت	۴۶±۶^{b}	۸۶±۴^{a}	۸۹±۵^{a}	۹۲±۱^{a}	۹۷±۱/۰۹^{a}
۴۸ ساعت	۳۲±۹ ^{b}	۷۶±۹/۰۶ ^{a}	۸۷±۵ ^{a}	۹۰±۱^{a}	۹۷±۱ ^{a}
۷۲ ساعت	۲۸±۱۰^{b}	۷۳±۹ ^{a}	۸۴±۵ ^{a}	۸۶±۱ ^{a}	۹۷±۱ ^{a}

*تیمار تغذیه شده با غذای بدون مکمل پروبیوتیکی و بدون مواجهه با باکتری ویبریو کمپلی

مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در سطرها نشان دهنده معنی داری در سطح ۰/۰۵ می باشد

www.SID.ir

Archive of SID

۳.۳. ترکیب لاشه

نتایج حاصل از تأثیر پروبیوتیکهای باسیلوس سابتیلیس و مخمر ساکارومایس سرویسیه بر ترکیب لاشه آرتمیا فرانسیسکانا در انتهای دورهٔ پرورش در جدول۳ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود از نظر مادهٔ خشک اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد وجود نداشت ($P >$۰/۰۵). اختلاف معنی داری در درصد خاکستر لاشه با تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد وجود داشت ($P <$ ۰/۰۵). از لحاظ درصد چربی خام لاشه در انتهای دوره‌ی پرورش بین تیمار ۴ با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P<$ ۰/۰۵) بطوریکه تیمار ۳ با میانگین ۲۷/۸۶ درصد و تیمار شاهد با میانگین ۲۰/۸۴ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را داشت. درصد پروتئین خام لاشه تیمار شاهد به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P <$ ۰/۰۵).

جدول۳- میانگین (± اشتباه معیار) تجزیه تقریبی لاشه آرتمیا فرانسیسکانا در تیمارهای مختلف در پایان دوره پرورش

	رطوبت	پروتئین خام	خاکستر	چربی خام
تیمار یک	۸۶/۰۸±۰/۳۴ [a]	۴۹/۶±۲/۵۸ [a]	۲۰/۸۴±۱/۵۵ [b]	۱۰/۷۴±۰/۲۵ [b]
تیمار دو	۸۶/۶۶±۰/۰۶ [a]	۴۲/۷۶±۱/۷۶ [b]	۲۱/۳۴±۲/۱۳ [b]	۱۰/۲۲±۰/۲۷ [b]
تیمار سه	۸۶/۱۳±۰/۳۴ [a]	۴۰/۹۳±۰/۸۴ [b]	۲۷/۸۶±۰/۸۶ [a]	۱۰/۳±۰/۱۵ [b]
تیمار چهار	۸۵/۷۶±۰/۲۳ [a]	۴۴/۱۳±۲/۲۸ [ab]	۲۵/۳±۱/۹۵ [ab]	۱۱/۵۶±۰/۲۰ [a]

حروف متفاوت در ستون ها نشان دهنده معنی داری در سطح ۰/۰۵ می باشد

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، پروبیوتیکهای *Bacillus subtilis* و *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان مکمل غذایی همراه با جیرهٔ غذایی آرتمیا مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پروبیوتیکها به صورت معنی داری بر بهبود رشد آرتمیا موثر بوده است. از آن جاییکه آرتمیا یک موجود فیلتر کننده غیر انتخابی است به همین دلیل از پروبیوتیکها مستقیماً به عنوان غذا و منبع اصلی تأمین پروتئین و تامین اسیدهای آمینه استفاده می‌شود (Gorospe *et al.*, 1996; Verschuere *et al.*, 1999). مخمر زنده به دلیل آنکه منبعی از پروتئینها است و محتوای نیتروژنی بالایی دارد (Tacon, 1994)، عملکرد رشد را بهبود می بخشد. مخمر زنده به عنوان منبعی از آنزیم ها مثل آمیلاز، پروتئاز و لیپاز عمل می کند که ممکن است هضم غذا و به دنبال آن، جذب را افزایش دهند. همچنین مخمر منبع خوبی از ویتامین B_6 است که ممکن است این ویتامین به عنوان کوآنزیم آنزیمهای دوپادکربوکسیلاز و دوپامین، هورمون رشد را تحریک کند (Tryfiates, 1986). مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با بهبود قابلیت هضم جیره و پروتئین، بهبود تغذیه از طریق چسبیدن به موکوس روده و تولید پلی آمینها بر عملکرد رشد و کارآیی غذایی ماهی باس راه راه هیبرید (*Morone chrysops* × *M. Saxatilis*) ، اثر مثبت می گذارد (Tovar *et al.*, 2002). باکتریهای جنس باسیلوس قادر به تولید و ترشح محدوده وسیعی از آنزیمهای خارج از سلولی می‌باشند (Moriarty, 1998). باکتری*Bacillus subtilis* با تولید ویتامین‌های گروه B باعث بازماندگی بیشتر در آبزیان می‌شود برای داشتن اثرات مفید به صورت محرک رشد یا محافظت موجود زنده در برابر باکتریهای بیماریزا، سویه ها باید مواد مهمی مانند ویتامین B تولید کنند (Goldin and Gorbach, 1992 ; Ghosh *et al.*, 2007). طی تحقیقی، باکتریهای *Bacillus subtilis* و *Bacillus Licheniformis* به عنوان مکمل غذایی و همراه با غذا در اختیار *Artemia urmiana* قرار گرفتند و نتایج حاکی از آن بود که باکتریهای مورد نظر به میزان معنی داری موجب افزایش وزن و طول کل آرتمیا شدند. همپنین میانگین رشد روزانه، افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی بطور

www.SID.ir

Archive of SID

معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود (Ahmadnia Motlagh *et al*., 2013). گونه *Artemia urmiana* با پروبیوتیک مخمر *Phaffia rhodozyma* غنی سازی شد و اثرات این مخمر به مدت ۳۰ روز بر رشد و بقاء آرتمیا بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که این پروبیوتیک اثر معنی‌داری بر نرخ بقاء و طول آرتمیا داشت (Shoja *et al*., 2012) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. غنی سازی آرتمیا و استفاده از آن در تغذیه لارو آبزیان با اهداف مختلفی صورت گرفته است. یکی از موارد استفاده از این تکنیک به منظور مقاوم سازی ماهی و میگو در مقابله با باکتریهای پاتوژن می باشد. در موارد دیگر ناپلی غنی شده باعث افزایش میزان بازماندگی در موجود آبزی و ارتقاء فاکتورهای رشد شده است.

به طور کلی استفاده روزانه از پروبیوتیک به عنوان مکمل باعث ایجاد مقاومت در *Artemia franciscana* در برابر عامل بیماریزای *Vibrio campbellii* می شود که این می تواند ناشی از برخی از خصوصیات ویژه پروبیوتیک مثل تولید ترکیبات بازدارنده باشد (Abdelkarim *et al*., 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیکها به طور معنی داری باعث افزایش بازماندگی در آرتمیای مولد در مواجهه با باکتری بیماریزا *Vibrio campbellii* شدند. به طوریکه در تیماری که مخمر و باکتری به نسبت ۵۰٪ مورد استفاده قرار گرفتند بیشترین بازماندگی را نشان داد. جمعیتهای میکروبی ممکن است مواد شیمیایی تولید کنند، که اثرات ضد باکتریایی روی سایر جمعیتهای میکروبی داشته باشد. حضور باکتریهای مولد ترکیبات بازدارنده در روده و در پوست میزبان و حتی در محیط کشت می تواند از تکثیر عوامل بیماریزای فرصت طلب جلوگیری کند که می‌توانند ناشی از تغییر در روابط بین جمعیتی برای رقابت جهت دستیابی به مواد شیمیایی و انرژی قابل دسترس باشد. به طور کلی، اثر ضد باکتریایی یک باکتری ناشی از تولید عواملی مانند: آنتی بیوتیکها، باکتری کشها، سایدوفورها، لیزوزیم، پروتئازها، پراکسید و تغییر مقادیر pH و اسیدهای آلی می باشد (Sugita *et al*., 1997). باسیلوسها با ممانعت یا کاهش چسبیدن پاتوژنها، تحریک دستگاه ایمنی میزبان و تولید اسید، پراکسید هیدروژن و باکتریوسینهای ضد رشد بیماری زا باعث کاهش تلفات در آبزیان می شوند (Vázquez *et al*., 2005). گزارش کردند که استفاده از باکتریهای پروبیوتیک تأثیر مثبتی بر روی بازماندگی آرتمیا در زمان مواجهه با *ویبریو کمپبلی* دارد (Marques *et al*., 2006). مخمرها ممکن است از طریق چسبیدن به سلول های باکتریایی (Gedek, 1999) یا ترشح پروتئازها که مانع عمل توکسینها می گردند (Castagliuolo *et al*., 1999)، اثرات ضد پاتوژنی داشته باشند. در مخمرها، ترکیباتی مثل اسیدهای چرب، گلیکوپروتئینها (Walker, 1998) و پلی‌ساکاریدهایی مثل کیتین (Esteban *et al*., 2001) به میزان کم وجود دارند که باعث تحریک ایمنی می شوند. در کنار این ترکیبات، ß- کاروتن، اسید چرب امگا ۳ و RNA مخمر نیز به عنوان محرکهای ایمنی شناخته شدند (Choudhury *et al*., 2005). همچنین مخمرها، پلی آمین ها را تولید می کنند و برخی سویه ها، پتانسیل چسبندگی قوی به موکوس روده دارند که شرایط مهمی برای کارایی پروبیوتیکها است (Tovar *et al*., 2002). دیواره های سلولی مخمر در برگیرنده ترکیبات غیر مغذی خیلی مهمی از جمله مانوپروتئینها (پلیمرهای مانوز متصل به پپتیدها از طریق پیوند کووالانسی)، گلوکانها (پلیمرهای گلوگز)، کیتین به میزان جزئی (Cabib *et al*., 1982) اسیدهای نوکلئیک (Rumsey *et al*., 1992) هستند، به طوری که طبق نظر Rumsey و همکاران (۱۹۹۲) ، حدود ۷/۷٪ و ۱٪ سلولهای مخمر را به ترتیب گلوکان و کیتین خام تشکیل می دهند; این ترکیبات می توانند برای سلامت آبزیان، سودمند باشند. در تحقیقی انجام شده توسط Patra و Mohamed (۲۰۰۳) بازماندگی بالایی در آرتمیا غنی شده با مخمر *Saccharomyces boulardii* در مواجهه با باکتری بیماریزا *vibrio harveyi* مشاهده شد. که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مطالعات میکروبیولوژی نشان می دهد که *Bacillus* sp و *Aeromonas hydrophyla* می تواند آرتمیا را در مقابل پاتوژنهایی مثل *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolyticus* محافظت نماید (Marques *et al*., 2006). تأثیر مخمر ساکارومایس

www.SID.ir

Archive of SID

سروزیه بر افزایش باکتریهای اسید لاکتیک دستگاه گوارش میزبان که این باکتریها بطور مستقیم مانع تکثیر پاتوژنهای فرصت طلب می شود و بطور غیر مستقیم با تولید اسید های چرب کوتاه زنجیر، سیستم ایمنی را تحریک می کند (David *et al*., 1999; Mahious and Ollevier, 2005).

در مطالعه حاضر افزایش معنی داری در میزان خاکستر در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد که می تواند ناشی از استفاده موثرتر از ترکیبات غذایی در حضور پروبیوتیک ها باشد. هر چند نمی توان تأثیر ترکیبات مواد غذایی مورد مصرف در پرورش آرتمیا را در ترکیب لاشه این موجود مد نظر قرار نداد (Yamada and Sgarbieri, 2005). اثر مثبت باکتریهای باسیلوس پروبیوتیکی در افزایش معنی دار پروتئین خام و رطوبت لاشه در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد بچه ماهیان انگشت قد قزل آلا رنگین کمان مورد تأثیر قرار گرفته است (Bagheri *et al*., 2008) که بر خلاف نتایج حاضر می باشد. در مطالعه حاضر پروبیوتیکهای مورد استفاده نتوانستند تأثیر معنی داری در افزایش پروتئین خام لاشه داشته باشند.که می تواند بدلیل مقدار کم چربی در تیمارها باشد که باعث شده از پروتئین برای تامین انرژی مورد نیاز استفاده کند. افزایش معنی داری در محتوای خاکستر و پروتئین بدن در ماهیان زنده‌زای تغذیه شده با باکتری *Bacillus subtilis* بدست آمد (Ghosh *et al*., 2008).

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که مکملهای پروبیوتیکی می توانند اثرات مطلوبی بر رشد و بازماندگی آرتمیا در مقابل باکتری بیماریزا ویبریو کمپلی داشته باشد. در این تحقیق بیشترین میزان بازماندگی مربوط به تیمار ۴ و ۲ بود که البته با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نداشت. بیشترین میزان طول مربوط به تیمار ۲ بود که از مخمر استفاده شده بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت. بیشترین میزان بازماندگی بعد از مواجهه با باکتری بیماریزا ویبریو کمپلی مربوط به تیمار ۳ بود که از باکتری باسیلوس سابتیلیس استفاده شده بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت. با توجه به نتایج بدست آمده در این آزمایش پیشنهاد می گردد که از پروبیوتیکهای *Bacillus subtilis* و *Saccharomyces cerevisiae* بصورت مکمل برای افزایش رشد و مقاومت آرتمیا در برابر عوامل بیماریزا استفاده گردد.

References

Abdelkarim, M., Kamel, C., Fathi, K., Amina, B., 2010. Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improrment of the conditions of artemiaculture and protection against pothogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 107 – 115.

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, Iranian Journal of Natural Resources*, 65, 353-364.

Ahmadvand, Sha., Jafaryan, H., Farahani, A., Ahmadvand, She., 2012. Effect of frozen *Daphnia magna* diet mixed with probiotic protexin on growth and survival of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry reared under controlled condition. *Animal and Feed Research*, 1, 34-39.

AOAC. 1990. In: W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analyses, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington. 445 p.

Atashbar, B., Agh, N., Beladjal, L., Jalili, R., Mertens, J., 2012. Effect of temperature on survival, growth, reproductive and life span characteristics of *Branchinecta orientalis* G.O. Sars, 1901 (Branchiopoda: Anostraca) from Iran. *Crustaceana*, 85(9), 1099-1114.

Austin, B. 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press, Combridge.

Azewedo, P. A., Leeson, S., Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2004. Growth and feed utilization of size rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in fresh water: diet and species effects and responses over time. *Aquaculture Nutrition*, 10, 401-411.

Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, A., 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 43-48.

Balcazer, J.,Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham,

www.SID.ir

Archive of SID

D., Vendrell, D., Muzquiz, J., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.

Bengston, D., Leger, P.H. Sorgeloos, P., 1991. Use of Artemia as a food source for aquaculture. *Artemia Biology*, 11, 255-285.

Cabib, E., Roberts, R., Bowers, B., 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 763-793.

Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity*, 67, 302-307.

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

Choudhury, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Kumar, S., Das, S.S., Mukherjee, S.C., 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophyla* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 19, 281-291.

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 World Aquaculture Society*, 21(1), 1–9.

David, J.A., Cyrill, J., W.C., Kendall, W.C., Vuksan, V., 1999. Inuline, oligofructose and intestinal function. *Journal of Nutrition*, 129, 1431-1433.

Dehghan, M., Jafariyan, H., Habibi, M., 2011. Potential of brine shrimp (*Artemia urmiana*) enrichment with two species of bacillus and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3, 523-528.

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., 2011. Microbial Manipulations to improve fish health and production –A Mediterranean perspective . *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 1-16.

Edward, NA., Hassall. 1980. Nitrogen metabolism and the biochemistry of amino acids in: Biochemistry and physiology of the cell, 2nd ed. Mc Graw-Hall Book Company (UK) limited, pp. 303-335.

Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J., Mesguer, J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 11: 303-315.

FAO, 2010. The State of World fisheries and aquaculture. Food and Agriculture organization of the United nations, Italy.

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

Gedek, B.R. 1999. Adherence of *Escherichia coli* serogroup 0 157 and the Salmonella typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42, 261-264.

Ghosh, S.A., Sinha., C. Sabu, 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.

Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, 14, 289-299.

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

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., 1992. Probiotics for Humans. In: The Scientific Basis, Fuller, R. (Ed.). Chapman and Hall, New York, USA, pp. 353-376.

Gorospe, J.N., Nakamura, K., Abc, M., Higashi, S., 1996. Nutritional of *Pseudomonas* sp. In Artemia culture. *Fish Science*, 62, 914 – 918.

Hafezieh, M., 2004. Effect of chaetocerus, *Chlorella* as food on growth and survival rate of *Artemia urmiana*. *Pajouhesh and Sazandegi*, 64, 76-80.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H., Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 17, 498-504.

Intriago, P., Jones, D.A. 1993. Bacteria as food for Artemia. Aquaculture, 113, 115-127.

Lavens, P., Sorgeloos, P. 1996. Mannual on the production and use of live food for Aquaculture. F.A.O Technical paper, No. 361, 295 p.

Mahious, A. & Ollevier, F. 2005. Probiotics and Prebiotics in Aquaculture. 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture. Urmia, Iran: AAARC.

Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2004. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312(1), 115-136.

Marques, A., Huynh Thannh, T., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P., 2006. Bossier, Yeast to Orotect gnotobiotic Artemia against different pathogens. *Journal of Experimental Maria Biology and Ecology*, 334, 20- 30.

Merrifield, D.L. Dimitroglou, A., Foey, A., 2010. The current status and future facus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aqaculture*, 302: 1-18.

Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* Species in penoeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351- 358.

Nayak, SK., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*, 29, 2-14.

Orozco – medina, C., Maedo – Mortnez, A. M., Lopez – Cortes, A., 2002. Effect of aerobic Gram positive heterotrophic bacteria associated with Artemia fronciscana cycts on

www.SID.ir

Archive of SID

the Survival and growth. *Aquaculture*, 213, 15- 29.

Parker, R.B., 1974. Probiotics the other half of half of the antibioticstory. *Animal Nutrient Health*, 29, 4-8.

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

Rumsey, G.L., Winfree, R.A., Hughes, S.G., 1992. Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to Rainbow trout. Aquaculture. 108: 97-110.

Ringo, E., bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A., Olsen, R.E., 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelila mucosa and from feacalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 855-867.

Ringo, E., Birkbeck, T.H., 1999. Intestinal microflora of fish and fry. *Aquaculture Research*, 30, 73-93.

Shoja, B., Ahmadi, A.R., Rafie, F., Nejatkha Manavi, P. 2012. Influence of probiotic yeast Pfaffia rhodozyma on growth: survival and maturity of Atremiaurmiana. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 3, 355–359.

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

Sorensen, M., Storebakken, T., Shearer, K.D., 2005. Digestibility, growth and nutrient retention in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets extruded at two different temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 11, 251- 256.

Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manuat for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquacukture. State University of Ghent, Belgium. 319 p.

Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., Deguchi, Y. 1997. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against Pasteurella piscicida. *Applied and Enviromental Microbiology*, 63, 4986-4989.

Tacon, A.G.J., 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species: alternatives to fishmeal and other dietary resources, FAO Fisheries Circular, No. 881, 35 p.

Tover, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F., Vazquez-Juarez, R., Lesel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204: 113-123.

Tryfiates, G.P., 1986. Pyridocal phosphate and metabolism, Part B, pp. 422-447, Vitamin B6, Pyridoxal Phosphate, Dolphin, D, Poulson, R, Avramovil, O (Eds), USA, John Willay and Sons, Inc.

Tukmechi, A., Rahmati Andani, H., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N., 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 923- 930.

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

Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245, 149-161.

Verschuere, L., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 1997. Monitoring biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of Artemia juveniles. Journal of Applied Microbiology, 83, 603-612.

Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstroete, W., 1999. Microbial control of the culture of Artemia juveniles through preemptive colonization by selected bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2527-2533.

Walker, GM., 1998. Yeast physiology and biotechnology, Chichester, John Wiley and Sons.

Yamada, E.A., Sgarbieri, V.C., 2005. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: preparation, chemical composition and nutritional and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 3931-3936.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir