

تعیین شرایط بهینه غنی سازی آرتمیا اورمیا با دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس سابتیلیس

امیر توکمه چی^{۱*}، رامین مناف فر^۱، فرزانه نوری^۲

^۱ گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ گروه تغذیه و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: a.tukmachi@urmia.ac.ir

چکیده

آرتمیا به عنوان ناقل بسیاری از ترکیبات مغذی و مواد مختلف نظیر داروها و غیره، اهمیت ویژه‌ای در تغذیه آبزیان به خصوص در دوران لاروی دارد. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر با توجه به توانایی آرتمیا در حمل پروبیوتیک‌ها تعیین بهترین شرایط غنی سازی آن از نظر شوری، دما، زمان افزودن باکتری و تراکم با دو پروبیوتیک مهم یعنی لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس سابتیلیس بود. برای این منظور یک آزمایش دو مرحله‌ای طراحی شد، در مرحله نخست بهترین شرایط غنی سازی از نظر دما، شوری و زمان افزودن به طور جداگانه برای هر دو باکتری تعیین گردید. سپس در مرحله دوم مطالعه بر اساس نتایج فاز نخست در دما، شوری و زمان بهینه میزان تراکم ایده‌آل نیز برای هر دو باکتری محاسبه شد. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که شرایط بهینه غنی سازی از نظر شوری، دما، ساعات افزودن باکتری و غلظت مناسب برای پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* به ترتیب برابر با ۳۰، ۳۲ درجه سانتی گراد، ۶ ساعت و 10^6 CFU/ml است. در حالیکه شرایط ایده آل غنی سازی از نظر شوری، دما، ساعات افزودن باکتری و غلظت مناسب برای پروبیوتیک *Bacillus subtilis* به ترتیب برابر با ۴۰، ۲۸ درجه سانتی گراد، ۹ ساعت و 10^7 CFU/ml است. نتایج حاصل از این بررسی ثابت کرد که بسته به نوع باکتری شرایط بهینه غنی سازی نیز متفاوت می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که آرتمیا اورمیا از پتانسیل بالقوه‌ای برای حمل پروبیوتیک‌ها برخوردار است و در صورت رعایت شرایط بهینه غنی سازی می‌توان بر این توانایی افزود.

واژگان کلیدی: آرتمیا اورمیا، غنی سازی، پروبیوتیک، بهینه سازی

مقدمه

آرتمیا سخت‌پوست کوچک و بسیار ظریفی بوده که به زندگی در آب‌های بسیار شور سازش یافته و به دلیل عدم وجود شکارچی و رقبای غذایی در چنین محیط‌هایی به طور معمول از ظرفیت رشد و تولید بالایی هم برخوردار است. آرتمیا با داشتن میزان بالایی از پروتئین (در حدود ۵۵ درصد)، چربی (۴ تا ۲۰ درصد) و تمامی اسیدهای آمینه ضروری در مقادیر بسیار مناسب و اکثر اسیدهای چرب در حد مطلوب از ارزش غذایی بسیار بالایی برخوردار است. استفاده از آرتمیا جهت تغذیه آبزیان از دهه ۱۹۳۰ آغاز گردید (Bengston et al., 1991)، در حال حاضر نیز از آن به عنوان بهترین غذای زنده جهت

پرورش میگو، ماهیان دریازی، ماهیان آب شیرین و ماهیان زینتی شناخته شده است (آق، ۱۳۷۵). امروزه جهت بهبود ارزش غذایی آرتمیا و نیز ورود و افزایش مقادیر برخی از ویتامین‌ها به خصوص ویتامین E و C به لحاظ اثرات ایمنی زایی، مقاومت در برابر استرس‌ها، عوامل بیماری‌زا، همچنین آنتی بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، پروبیوتیک‌ها و غیره از تکنیک غنی سازی استفاده می‌شود (Patra and Mohamed, 2003). غنی سازی عملی است که در آن طی یک دوره کوتاه مدت تغذیه فشرده با ترکیبات مغذی، ارزش غذایی آرتمیا افزایش یافته و آنرا به یک غذای کامل تبدیل می‌کند.

cerevisiae تعیین کردند و نشان دادند بهترین موقع غنی سازی ۶ ساعت پس از افزودن مخمر به لارو تازه تخم گشایی شده است. مرور منابع علمی نشان داد که تاکنون هیچ گونه تحقیقی در زمینه بهینه سازی غنی سازی ناپلی آرتمیا با لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس سابتیلیس به خصوص در آرتمیا اورمیا انجام نشده است. همچنین با توجه به نقش آرتمیا به عنوان غذای زنده در تغذیه لارو ماهیان و میگو هدف از مطالعه حاضر بهینه سازی غنی سازی ناپلی آرتمیا اورمیا با باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس سابتیلیس بود.

مواد و روش ها

تهیه باکتری و آماده سازی آن ها

باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوسوس (BCCM/LMG^۷ 18243) و باسیلوس سابتیلیس (ATCC^۸ 6633) به عنوان پروبیوتیک به صورت ویال لیوفیلیزه تهیه شدند. کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط MRS براث و باسیلوس سابتیلیس در آبگوشت مغذی با دمای ۳۰ °C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و در شرایط هوازی انجام شد. پس از رشد باکتری ها توسط آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشگاه آرتمیا و آبزیان تأیید تشخیص شدند. برای آماده سازی باکتری ها از محیط های کشت آبگوشت MRS^۹ و آبگوشت مغذی استفاده شد، پس از رشد باکتری ها در کرایوتیوب و در حضور ۲۰ درصد گلیسرین تا زمان استفاده در ۸۰ °C - نگهداری شدند.

تهیه سیست آرتمیا اورمیا و پوسته زدایی^{۱۰}

سیست های مورد نیاز از پژوهشگاه آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. برای پوسته زدایی

پروبیوتیک ها عبارتند از ارگانیزم ها یا موادی که در تعادل میکروبی روده میزبان نقش دارند. در آبی پروری اولین بار Yasuda و Taga (1980) پیش بینی کردند که باکتری هایی وجود دارند که نه تنها به عنوان غذا بلکه به عنوان کنترل کننده بیولوژیک بیماری های آبزیان و فعال کننده چرخه مواد غذایی عمل می کنند. امروزه خواص پروبیوتیکی باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوسوس (Nikoskelainen et al., 2001) و باسیلوس سابتیلیس (Rengipat et al., 1998) به ترتیب در ماهی قزل آلا رنگین کمان و میگوی ببری^۶ ثابت شده است. هر دوی این باکتری ها موجب تقویت رشد میزبان و افزایش بقا و نیز تحریک پاسخ های ایمنی غیر اختصاصی آن می گردند.

Gatesoupe در سال ۱۹۹۱ اظهار داشت که آرتمیا را می توان به عنوان ناقل پروبیوتیک به کار برد. همچنین ایشان گفتند که کارایی این روش بستگی به زنده یا مرده بودن باکتری، زمان مجاور شدن و نهایت نوع باکتری دارد. این محقق در مطالعه دیگری (۱۹۹۳) پیرامون غنی سازی روتیفر با پروبیوتیک ثابت کرد که حداکثر جذب پروبیوتیک در ساعات اولیه زندگی یعنی در مراحل لاروی است. در ادامه Makridis و همکاران (۲۰۰۲) به طور مشخص پی بردند که غنی کردن غذاهای زنده نظیر آرتمیا و روتیفر با پروبیوتیک ها تا ۱۰۰ درصد به استقرار باکتری در روده لارو آبزیان کمک می کند. بعدها Patra و Mohamed (۲۰۰۳) آرتمیا فرانسیسکانا را با پروبیوتیک انسانی یعنی *boulardi* غنی سازی کردند و نتیجه گرفتند که پس از مدت زمان ۷۲-۴۸ ساعت از افزودن مخمر به ناپلی آرتمیا بیشترین مقدار غنی سازی بدست می آید. تا اینکه در سال ۲۰۰۶ Fazeli و Azari Takami بهترین زمان غنی سازی ناپلی آرتمیا اورمیا را برای مخمر *Saccharomyces*

سیست‌های آرتمیای از روش استاندارد Bengston و همکاران (1991) استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا سیست‌های آرتمیای به مدت ۱-۲ ساعت در آب شیرین و دمای 25°C هیدراته شدند. پس از هیدراته شدن با الک ۱۲۵ میکرومتر جمع آوری و آب کشی شدند. در مرحله بعد سیست‌ها داخل محلول هیپوکلریت سدیم ($0/5$ گرم به ازاء هر گرم سیست) حاوی $0/15$ گرم NaOH (جهت افزایش pH تا ۱۰) اضافه شدند. سپس اجازه داده شد محلول فوق به مدت ۱۰-۵ دقیقه در آب سرد با دمای $20-15^{\circ}\text{C}$ قرار داده شوند تا کپسول‌زدایی انجام گیرد. سپس سیست‌ها با الک ۱۲۵ میکرومتری جمع آوری و آب کش شدند و به مدت یک دقیقه در محلول $0/1$ نرمال اسید کلریدریک قرار دادند تا هیپوکلریت اضافی غیر فعال گردد. در خاتمه سیست‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

تخم‌گشایی سیست‌های کپسول‌زدایی شده

برای اینکار از روش استاندارد Sorgeloos و همکاران (1986) استفاده شد. در این روش آب دریای اتوکلاو شده فیلتر شده (FASW^{11}) با شوری 33 گرم در لیتر، دمای 28°C ، pH حدود $8/5-8$ ، نور 2000 لوکس و اکسیژن $0/6$ میلی گرم در لیتر به عنوان شرایط استاندارد تخم‌گشایی انتخاب شد. در مرحله بعد مقدار ۱ گرم سیست کپسول‌زدایی شده به داخل زوک (با گنجایش دو لیتر) ریخته شده و اجازه داده شد تا عمل تخم‌گشایی تحت شرایط استاندارد انجام گیرد. تمامی مراحل تخم‌گشایی در شرایط استریل و زیر هود لامینار فلو انجام شد، همچنین به منظور پیشگیری از هر گونه آلودگی باکتریایی از کلرآمفینیکل (30 mg/ml)، تریمتوپریم (40 mg/ml) و سولفامتوکسازول (80 mg/ml) استفاده شد (Gomez-Gil et al., 1998).

طراحی آزمایش

پس از تخم‌گشایی سیست‌های کپسول‌زدایی شده ($24-18$ ساعت) برای جداسازی لاروهای اینستار II آرتمیای از پوسته سیست‌ها و مواد زائد دیگر از ویژگی نورگرایی مثبت لاروهای آرتمیای استفاده گردید. لاروهای آرتمیای قبل از شروع غنی‌سازی در آب شور (35 ppt) استریل جمع آوری و شمارش شدند. غنی‌سازی ناپلی آرتمیای در فالكون تیوب‌های استریل 50 ml با تراکم 200 ناپلی در هر میلی لیتر آب انجام شد. بهینه‌سازی غنی‌سازی در شوری‌های (10 ، 20 ، 30 ، 40 گرم در لیتر)، دماهای (26 ، 28 ، 30 ، 32°C) و زمان‌های (صفر، 3 ، 6 ، 9 و 12 ساعت) انجام گرفت. در مرحله نخست مطالعه به طور ثابت از تراکم 10^7-10^8 CFU/ml باکتری‌های *ل. رامنوسوس* و *ب. سابتیلیس* استفاده شد.

در مرحله دوم آزمایش بر اساس نتایج بدست آمده از مرحله نخست شرایط بهینه غنی‌سازی از نظر شوری، دما و زمان افزودن برای هر باکتری انتخاب و دوزهای متفاوت باکتری‌ها یعنی 10^5 ، 10^6 ، 10^7 CFU/ml و 10^8 مورد بررسی قرار گرفت. کشت *ل. رامنوسوس* در محیط MRS براث و *ب. سابتیلیس* در نوترینت براث و شرایط هوازای، دمای 30°C به مدت $24-48$ ساعت صورت گرفت. پس از رشد ابتدا محیط کشت به مدت 15 دقیقه در دمای 4°C با دور 4 rpm 2500 سانتریفیوژ و رسوب آنها با سرم فیزیولوژی استریل سه مرتبه شستشو داده شده و در نهایت با استفاده از لوله‌های استاندارد مک فارلند تراکم‌های مورد نظر تنظیم شد. لازم به ذکر است که آزمایش دو بار تکرار و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

نمونه‌برداری

در آزمایش‌های انجام گرفته به منظور بررسی‌های باکتری شناسی نمونه برداری در زمان‌های 6 ، 12 ، 18 و 24 ساعت انجام شد. برای اینکار ابتدا هوادهی لوله‌ها قطع شده بلافاصله به صورت استریل مقدار 1000 میکرولیتر از محتویات داخل فالكون‌ها شامل ناپلیوس آرتمیای و آب داخل آنها نمونه برداری شد. برای بررسی

11-Filtered Autoclaved Sea water

طور مخفف HSD نامیده می شود) استفاده گردید. در تمام بررسی ها سطح معنی دار آزمون ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

نتایج مرحله نخست غنی سازی در مورد هر دو باکتری در جداول ۱ تا ۳ اشاره شده است. بر اساس این داده ها شرایط بهینه غنی سازی ناپلی آرمیا/اورمیا با باکتری *L. رامنوسوس* شوری ppt ۳۰، دمای 32°C و زمان ۶ ساعت برای افزودن باکتری می باشد. همچنین شرایط بهینه غنی سازی ناپلی آرمیا/اورمیا با باکتری *B. سابتیلیس* شامل ppt ۴۰، دمای ۲۸ و زمان ۹ ساعت برای افزودن باکتری بدست آمد. همچنین نتایج مربوط به شمارش باکتری های چسبیده شده به بدن ناپلی آرمیا/اورمیا در جداول ۴ تا ۶ اشاره شده است.

همانطور که اشاره شد تاثیر تراکم های مختلف باکتری ها بر اساس یافته های فوق یعنی در شرایط بهینه انجام گرفت. نتایج این مرحله از مطالعه در جداول ۷ و ۸ آورده شده است. این نتایج نشان می دهند که بیشترین مقدار غنی سازی ناپلی آرمیا/اورمیا با باکتری *L. رامنوسوس* در تراکم 10^5 CFU/ml بدست آمد که فقط با تراکم 10^5 CFU/ml اختلاف آماری معنی دار ($P < 0.05$) داشت. همچنین در مورد *B. سابتیلیس* بیشترین مقدار غنی سازی در تراکم 10^8 CFU/ml بدست آمد که با تراکم 10^6 و 10^5 اختلاف آماری معنی داری ($P < 0.05$) نشان داد. نتایج مربوط به مقدار بقای ناپلی آرمیا/اورمیا در مرحله دوم مطالعه در نمودار ۱ آورده شده است. بر این اساس بیشترین درصد بقای ناپلی آرمیا/اورمیا در تراکم های کم باکتری یعنی 10^5 CFU/ml و 10^6 بدست آمد که در مقایسه با تراکم 10^8 CFU/ml در سطح $P < 0.05$ اختلاف آماری معناداری مشاهده شد.

باکتری شناسی ابتدا به کمک الک ۸۰ میکرومتری ناپلیوس ها بصورت استریل جمع آوری و سپس توزین شدند. در مرحله بعد ناپلیوس ها بطور کاملاً مساوی به دو قسمت تقسیم شدند، هدف از این کار مقایسه میزان پروبیوتیک های وارد شده به داخل بدن و پروبیوتیک های چسبیده به سطوح خارجی ناپلیوس آرمیا می باشد. به منظور شمارش باکتری های وارد شده به دستگاه گوارش ناپلیوس، ابتدا با استفاده از محلول ۱ درصد کلرید بنزالکونیوم^{۱۲} ضد عفونی و سپس به کمک دستگاه هموژن کننده در کنار یخ هموژن شدند (Rengpipat et al., 1998). سپس رقت های سریال (10^{-1} - 10^{-8}) از ناپلیوس های هموژن شده در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و شمارش توتال پلیت کاونت بر روی محیط های MRS آگار و نوترینت آگار انجام شد. کشت پلیت ها در دمای 30°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و در شرایط هوازی انجام شد.

همچنین جهت شمارش باکتری های چسبیده شده به سطوح خارجی ناپلیوس آرمیا قسمت دوم آنها بدون شستشو هموژن شده و روش فوق شمارش انجام شد. اختلاف تعداد باکتری های شمارش شده در دو حالت فوق برابر خواهد بود با میزان چسبندگی باکتری به سطح خارجی ناپلیوس.

تعیین بقاء ناپلیوس آرمیا

در این مطالعه به منظور تعیین بقاء ناپلیوس های غنی شده ۲۴ ساعت پس از شروع غنی سازی شمارش ناپلیوس های هر لوله به طور جداگانه انجام گردید (Patra and Mohamed, 2003).

تجزیه و تحلیل های آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه^{۱۳} (ANOVA)؛ نرم افزار SPSS نسخه (۱۷) و آزمون توکی^{۱۴} (آزمون اختلاف حقیقی که به-

12-Benzalchonium Chloride

13-One-Way Analysis of Variance

14-Tukey's Test

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر غنی سازی آرتمیا یا پوشش دار کردن زیستی^{۱۵} یکی از بهترین روش های موجود است که می تواند با اهداف متعددی انجام گیرد: افزایش ارزش تغذیه ای آرتمیا، انتقال تراکم بالایی از پروبیوتیک ها، حفظ پروبیوتیک در برابر شرایط نامساعد محیطی و غیره (Dhert et al., 1993; Aguila et al., 1994). در مطالعه حاضر مهمترین دلیل انتخاب *رامنوسوس* و *ب. سابتیلیس* جهت غنی سازی ناپلی آرتمیا اثبات خاصیت پروبیوتیکی آنها در آبزیان بود. Nikoskelinen و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که *ل. رامنوسوس* قادر است پاسخ های ایمنی سلولی و هورمونی ماهی قزل آلا را رنگین کمان را تحریک و مقاومت آن را در برابر سویه ی بیماری زای *Aeromonas hydrophyla* افزایش دهد. همچنین Ringipipat و همکاران (۱۹۹۸) خاصیت پروبیوتیکی *ب. سابتیلیس* را در میگوی ببری ثابت کردند.

در مطالعه حاضر بیشترین درصد بقاء ناپلیوس آرتمیا *اورمیا* $11/2 \pm 98/23$ درصد (*ل. رامنوسوس*) بود در حالی که Intriago and Jones (1993) گزارش کردند که مقدار بقای آرتمیا *فرانسیسکانای* پرورش داده شده با باکتری *Flexibacter* sp. به مدت هشت روز برابر با ۸۸ درصد می باشد. علت این تفاوت می تواند به دلیل گونه ی آرتمیا، طول مدت تغذیه و ویژگی های بیوشیمیایی باکتری های مورد مطالعه باشد. زیرا این محققین میزان بقاء ناپلیوس آرتمیا *فرانسیسکانا* را از دوره ناپلی تا مرحله قبل از بلوغ محاسبه کردند در حالی که ما درصد بقاء ناپلیوس آرتمیا را در دوران ناپلی و پس از گذشت ۲۴ ساعت از غنی سازی (یعنی ۴۸ ساعت پس از تخم گشایی) محاسبه کردیم.

نتایج مرحله اول مطالعه حاضر نشان می دهد که شرایط بهینه شوری برای غنی سازی ناپلی آرتمیا

اورمیا *ب. ل. رامنوسوس* و *ب. سابتیلیس* به ترتیب برابر با ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر می باشد. علت متفاوت بودن شوری می تواند ناشی از تحمل *ب. سابتیلیس* به شوری بیشتر نسبت به *ل. رامنوسوس* باشد، البته با جستجوی منابع علمی نتوانستیم دلیل مستدلی برای آن ارائه کنیم. همچنین از نظر تاثیر دماهای مختلف بر غنی سازی دمای بهینه برای *ل. رامنوسوس* 28°C و ۳۲ برای *ب. سابتیلیس* 28°C بود که این تفاوت می تواند به ماهیت باکتری ها نسبت داده شود. در رابطه با تاثیر زمان افزودن باکتری ها برای غنی سازی در مورد *ل. رامنوسوس* پس از ۶ ساعت از شروع غنی سازی مقدار باکتری وارد شده به دستگاه گوارش برابر با $3/1 \times 10^4$ CFU/ml می باشد، در حالی که در مورد *ب. سابتیلیس* زمان افزودن باکتری ۹ ساعت ثبت شد و در آن تراکم باکتری های وارد شده به دستگاه گوارش برابر با $1/9 \times 10^4$ CFU/ml شمارش گردید. علت این امر می تواند به اندازه باکتری ها نسبت داده شود، با توجه به اینکه آرتمیا یک موجود فیلتر کننده غیر انتخابی است لذا ذراتی که قطر آنها کمتر از ۵۰ میکرومتر (Lavens et al., 1996) باشد را به راحتی می بلعد. از طرف دیگر *ل. رامنوسوس* (Ding and Shah, 2009) دارای ابعادی برابر با ۴ میکرومتر بوده در حالیکه اندازه *ب. سابتیلیس* ۱۰ میکرومتر (Mamane et al., 2009) می باشد. این نشان می دهد که آرتمیا می تواند *ل. رامنوسوس* را به دلیل داشتن اندازه کوچکتر نسبت به *ب. سابتیلیس* به مقدار بیشتری وارد دستگاه گوارش نماید. فضلی و آذری تاکامی در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که بهترین زمان افزودن پروبیوتیک *ساکارومایسس سرویسسه* برای غنی سازی ناپلی آرتمیا *اورمیا* ۶ ساعت پس از شروع غنی سازی است. در نهایت با توجه به اینکه فلور باکتریایی دستگاه گوارش موجودات در اوایل دوران زندگی (Ringo and Brikbech, 1999) شروع به تشکیل می کند می توان گفت هم *ل. رامنوسوس* و هم

می‌چسبند. این نکته باید به هنگام استفاده از آرتمیای غنی شده با پروبیوتیک جهت تغذیه لارو آبزیان مد نظر قرار گیرد.

با توجه به اینکه غذاهای زنده نظیر آرتمیا، روتیفر و غیره می‌توانند ورود عوامل بیماری‌زا به داخل محیط-های پرورشی شوند (Patra and Mohamed, 2003) از این رو غنی سازی آنها با پروبیوتیک نه تنها باعث ممانعت از ورود عوامل بیماری‌زا به اینگونه محیط‌ها می‌شود بلکه روشی است نوین جهت معرفی پروبیوتیک‌ها به مرحله لاروی آبزیان. در نهایت بر اساس نتایج حاصل از بررسی حاضر می‌توان نتیجه گرفت که بسته به نوع پروبیوتیک و شرایط مختلف شوری، دما، ساعات افزودن و تراکم باکتری نتایج متفاوتی بدست می‌آید. این یافته‌ها در مورد /رمنوسوس شوری ۳۰ ppt، دمای ۳۲ °C زمان ۶ ساعت و تراکم CFU/ml ۱۰^۶ می‌باشد، در حالی که همین شرایط برای ب. سابتیلیس به ترتیب ۴۰ ppt، ۲۸ °C، ۹ ساعت و تراکم CFU/ml ۱۰^۷ می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده آرتمیا و آبزیان به خاطر حمایت‌های مالی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

ب. سابتیلیس توانسته‌اند به طور موفقیت آمیزی در دستگاه گوارش ناپلی آرتمیا/اورمیا جایگزین شوند. در مورد تعداد باکتری‌های وارد شده به دستگاه گوارش ناپلی آرتمیا/اورمیا و در شرایط بهینه شوری، دما و زمان افزودن برابر با CFU ۴/۰۶×۱۰^۴ و CFU ۳/۰۱×۱۰^۳ به ترتیب برای /رمنوسوس و ب. سابتیلیس به ازاء هر ناپلی بود. این مقادیر ثبت شده در مورد تراکم‌های CFU/ml ۱۰^۷ و ۱۰^۸ باکتری-های /رمنوسوس و ب. سابتیلیس به ترتیب بدست آمد. Van Hai و همکاران (2010) در مطالعه‌ای پیرامون غنی سازی ناپلیوس آرتمیا/فرانسیسکانا با دو پروبیوتیک *Pseudomonas synxantha* و *Pseudomonas aeruginosa* تراکم‌های CFU/ml ۱۰^۳، ۱۰^۵ و ۱۰^۷ را بکار بردند و متوجه شدند بیشترین مقدار غنی سازی در تراکم CFU/ml ۱۰^۵ بدست می‌آید و حداکثر باکتری که وارد دستگاه گوارش ناپلی می‌شود برابر با CFU ۳×۱۰^۴ به ازاء هر ناپلی می‌باشد. یافته‌های این محققان و یافته‌های ما نشان می‌دهد که نه تنها افزودن تراکم باکتری تاثیری بر میزان غنی سازی ندارد حتی می‌تواند میزان بقاء ناپلی آرتمیا را به صورت معنی داری (P<۰/۰۵) کاهش دهد (نمودار ۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که علاوه بر باکتری-هایی که از راه دستگاه گوارش وارد بدن آرتمیا می‌شوند، همواره تعدادی نیز باکتری به سطح بدن آن

جدول ۱. نتایج حاصل از تاثیر شوری‌های مختلف (ppt) بر تعداد باکتری‌های وارد شده به دستگاه گوارشی ناپلیوس آرتمیا اورمیانا پس از ۱۲ ساعت از شروع غنی سازی (CFU).

باکتری	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
ل. رامنوسوس	$8/6 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 a$	$3/5 \times 10^2 \pm 4/4 \times 10^2 a$	$1/7 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 b$	$4/1 \times 10^2 \pm 3/2 \times 10^2 a$	$8/3 \times 10^2 \pm 1/3 \times 10^2 a$
ب. سابتیلیس	$5/6 \times 10^2 \pm 3/2 \times 10^2 a$	$5/7 \times 10^2 \pm 2/2 \times 10^2 a$	$6/6 \times 10^2 \pm 2/4 \times 10^2 a$	$1/7 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2 b$	$8/7 \times 10^2 \pm 1/4 \times 10^2 a$

* اعداد به صورت $Mean \pm SE$ نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۲. نتایج حاصل از تاثیر شوری‌های مختلف (ppt) بر تعداد باکتری‌های چسبیده به سطح بدن ناپلیوس آرتمیا اورمیانا پس از ۱۲ ساعت از شروع غنی سازی (CFU).

باکتری	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
ل. رامنوسوس	$3/4 \times 10^2 \pm 2/0 \times 10^2 a$	$3/9 \times 10^2 \pm 2/2 \times 10^2 a$	$4 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 a$	$3/7 \times 10^2 \pm 2/8 \times 10^2 a$	$3 \times 10^2 \pm 1/6 \times 10^2$
ب. سابتیلیس	$8/6 \times 10^2 \pm 1/1 \times 10^2$	$8/9 \times 10^2 \pm 2/3 \times 10^2 a$	$7/8 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 a$	$7/6 \times 10^2 \pm 3/4 \times 10^2 a$	$7/3 \times 10^2 \pm 1/3 \times 10^2 a$

* اعداد بصورت $Mean \pm SE$ نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۳. نتایج حاصل از تاثیر دماهای مختلف ($^{\circ}C$) بر تعداد باکتری‌های وارد شده به دستگاه گوارشی ناپلیوس آرتمیا اورمیانا پس از ۱۲ ساعت از شروع غنی سازی (CFU).

باکتری	۲۶	۲۸	۳۰	۳۲	۳۴
ل. رامنوسوس	$5/4 \times 10^2 \pm 2/1 \times 10^2 a$	$6/0 \times 10^2 \pm 2/3 \times 10^2 a$	$6/8 \times 10^2 \pm 4/5 \times 10^2 a$	$2/0 \times 10^2 \pm 2/2 \times 10^2 b$	$8/4 \times 10^2 \pm 1/0 \times 10^2 a$
ب. سابتیلیس	$0/8 \times 10^2 \pm 0/9 \times 10^2 a$	$1/7 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2 b$	$2/0 \times 10^2 \pm 1/1 \times 10^2 a$	$1/5 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 a$	$1 \times 10^2 \pm 0/6 \times 10^2 a$

* اعداد بصورت $Mean \pm SE$ نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۴. نتایج حاصل از تاثیر دماهای مختلف ($^{\circ}C$) بر تعداد باکتری‌های چسبیده به سطح بدن ناپلیوس آرتمیا اورمیانا پس از ۱۲ ساعت از شروع غنی سازی (CFU).

باکتری	۲۶	۲۸	۳۰	۳۲	۳۴
ل. رامنوسوس	$0/6 \times 10^2 \pm 0/1 \times 10^2 a$	$0/5 \times 10^2 \pm 1/1 \times 10^2 a$	$0/7 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2 a$	$0/6 \times 10^2 \pm 1/9 \times 10^2 a$	$0/5 \times 10^2 \pm 1/2 \times 10^2 a$
ب. سابتیلیس	$3/2 \times 10^2 \pm 1/1 \times 10^2 a$	$3/6 \times 10^2 \pm 0/1 \times 10^2 a$	$3/5 \times 10^2 \pm 0/7 \times 10^2 a$	$3/3 \times 10^2 \pm 2/1 \times 10^2 a$	$3/6 \times 10^2 \pm 1/4 \times 10^2 a$

* اعداد بصورت $Mean \pm SE$ نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۵. نتایج حاصل از تاثیر افزودن پروبیوتیک در ساعت های مختلف بر تعداد باکتری های وارد شده به دستگاه گوارشی ناپلیوس آرمیا/اورمیا در طی غنی سازی (CFU).

باکتری	۳	۶	۹	۱۲	۲۴
ل. رامنوسوس	$2/1 \times 10^2 \pm 1/6 \times 10^2$ a	$3/8 \times 10^4 \pm 0/2 \times 10^2$ b	b	$3/48 \times 10^4 \pm 2/1 \times 10^2$ b	b
ب. سابتیلیس	$1/08 \times 10^2 \pm 1/09 \times 10^2$ a	$7/4 \times 10^3 \pm 0/6 \times 10^2$ a	$1/9 \times 10^4 \pm 2/6 \times 10^2$ b	$1/45 \times 10^4 \pm 1/12 \times 10^2$ b	$2/08 \times 10^4 \pm 0/9 \times 10^2$ b

* اعداد بصورت Mean±SE نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۶. نتایج حاصل از تاثیر افزودن پروبیوتیک در ساعت های مختلف بر تعداد باکتری های وارد شده به دستگاه گوارشی ناپلیوس آرمیا/اورمیا در طی غنی سازی (CFU).

باکتری	۳	۶	۹	۱۲	۲۴
ل. رامنوسوس	$0/09 \times 10^2 \pm 0/32 \times 10^2$ a	$2/3 \times 10^2 \pm 0/3 \times 10^2$ b	$2/19 \times 10^2 \pm 0/09 \times 10^2$ b	$2 \times 10^2 \pm 0/6 \times 10^2$ b	$1/9 \times 10^2 \pm 1/02 \times 10^2$ b
ب. سابتیلیس	$0/2 \times 10^2 \pm 0/1 \times 10^2$ a	a	$0/91 \times 10^2 \pm 0/07 \times 10^2$ b	$1 \times 10^2 \pm 0/6 \times 10^2$ b	$1/1 \times 10^2 \pm 1 \times 10^2$ b

* اعداد بصورت Mean ± SE نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۷. نتایج حاصل از تاثیر تعداد پروبیوتیک ها در شوری، دما و ساعت ایده آل بر غنی سازی* (CFU).

باکتری	۱۰ ^۵ CFU/ml	۱۰ ^۶ CFU/ml	۱۰ ^۷ CFU/ml	۱۰ ^۸ CFU/ml
ل. رامنوسوس	$7/6 \times 10^2 \pm 1/23 \times 10^2$ a	$3/86 \times 10^4 \pm 0/8 \times 10^2$ b	$4/06 \times 10^4 \pm 1/56 \times 10^2$ b	$3/82 \times 10^4 \pm 1/9 \times 10^2$ b
ب. سابتیلیس	$8/08 \times 10^2 \pm 1/34 \times 10^2$ a	$8/98 \times 10^2 \pm 2/76 \times 10^2$ a	$2/98 \times 10^2 \pm 2/09 \times 10^2$ b	$3/01 \times 10^2 \pm 3/8 \times 10^2$ b

* تعداد باکتری های وارد شده به دستگاه گوارشی ناپلیوس آرمیا/اورمیا در طی غنی سازی.

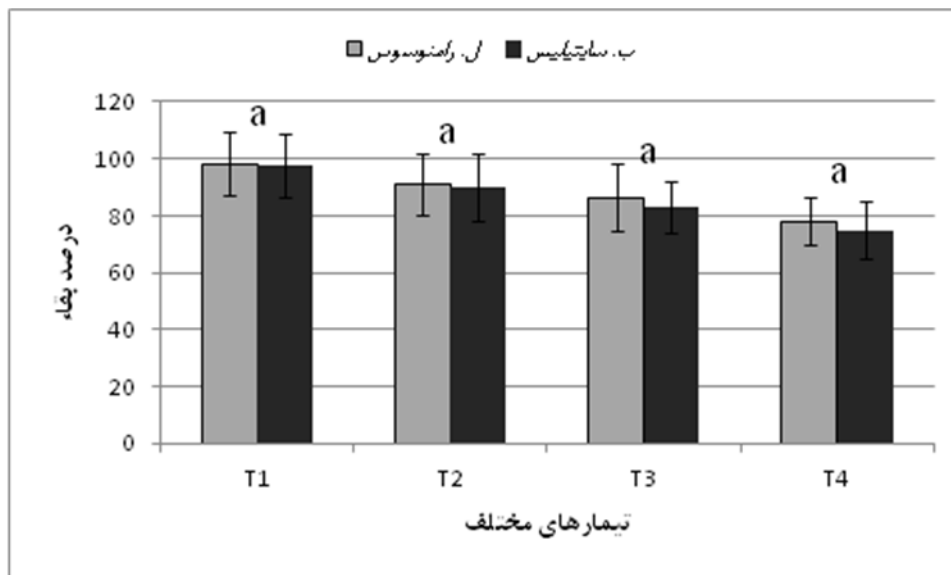
* اعداد بصورت Mean ± SE نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.

جدول ۸. نتایج حاصل از تاثیر تعداد پروبیوتیک ها در شوری، دما و ساعت ایده آل بر غنی سازی* (CFU).

باکتری	۱۰ ^۵ CFU/ml	۱۰ ^۶ CFU/ml	۱۰ ^۷ CFU/ml	۱۰ ^۸ CFU/ml
ل. رامنوسوس	$1 \times 10^2 \pm 0/5 \times 10^2$ a	$1/5 \times 10^2 \pm 1/53 \times 10^2$ a	$2/6 \times 10^2 \pm 1/56 \times 10^2$ a	$2/19 \times 10^2 \pm 0/9 \times 10^2$ a
ب. سابتیلیس	$0/96 \times 10^2 \pm 1/25 \times 10^2$ a	$1/2 \times 10^2 \pm 0/65 \times 10^2$ a	$1/7 \times 10^2 \pm 1/78 \times 10^2$ a	$1/87 \times 10^2 \pm 0/9 \times 10^2$ a

* تعداد باکتری های چسبیده به سطح بدن ناپلیوس آرمیا/اورمیا در طی غنی سازی.

اعداد بصورت Mean ± SE نشان داده شده است. حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد.



نمودار ۱. نتایج حاصل از تاثیر تعداد پروبیوتیک‌ها در شوری، دما و ساعت ایده آل بر بقاء ناپلیوس *آرتمیا اورمیان* (T1): تراکم 10^5 : T2، 10^6 : T3 و 10^8 : T4 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر). حروف یکسان بالای ستون‌ها نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنادار در سطح ($p < 0.05$) می‌باشد.

probiotic enrichment of *Artemia urmiana* nauplii. *Pakistanian Journal of Biological Science* 9(11): 2159-21.61.

7. Gatesoupe F.J. 1991. Managing the dietary value of *Artemia* in larval turbot, *Scophthalmus maximus*: the effect of enrichment and distribution techniques. *Aquaculture Engineering*, 10: 111-119.
8. Gatesoupe F.J. 1993. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In: Fish Nutrition in Practice Eds., Kaushik S.J. and Luque P. Vol. 61. INRA, Paris, France, Les Colloques, pp: 561-568.
9. Gomez-Gil B., Herrera-Vega M.A., Abreu-Grobois F.A. and Roque A. 1998. Bioencapsulation of Two different *Vibrio* species in nauplii of Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied Environmental Microbiology* 64(6): 2318-2322.
10. Intriago P. and Jones D.A. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113: 115-127.
11. Lavens P. and Sorgeloos P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center, University

منابع

۱. آق ن. ۱۳۷۵. *A. urmiana* سیکل زندگی و ارزش غذایی. (انتشارات مؤسسه تحقیقات و آموزشی شیلات ایران).
2. Aguila A.A., Mansir A.T. and Manriquez A.R. 1994. Using brine shrimp as a drug carrier for therapeutic applications in aquaculture. *Aquaculture Engineering* 13: 301-309.
3. Bengston D.A., Leger P., Sorgeloos P. 1991. Use of *Artemia* as a food for Aquaculture. In: *Artemia Biology*. Eds., Brown R.A., Sorgeloos P., Trotman C.N.A, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. pp: 225-258.
4. Dhert J., Lavens P. and Sorgeloos P. 1993. Preparation and use of *Artemia* as food for shrimp and prawn larvae. In: CRC Handbook in Mariculture, Vol. 1. Crustacean Aquaculture. McVey J. (ed) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 61-63.
5. Ding W.K., Shah N.P. (2009). Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *Journal of Food Science*, 74 (6): 231-236.
6. Fazeli Z. and Azari-Takami Gh. 2006. The best time and concentration for Yeast

- probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, 11: 505-514.
17. Rengpipat S., Phinaphak W., Piatirativorakul S., Menaced P., (1998). Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) survival and growth. *Aquaculture*, 167: 301-313.
18. Ringo E. and Birkbeck T.H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30: 73-97.
19. Sorgeloos P., Lavens P., Leger P., Tackaert W., Versichele D., 1986. Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. Artemia Reference Centre, Ghent, Belgium.
20. Van Hai N., Buller N. and Fotedar R. 2010. Encapsulation capacity of *Artemia* nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research* 41: 893-903.
21. Yasuda K., Taga N., (1980). A mass culture for *Artemia salina* bacteria as food. *La Mer.*, 18: 53-62.
- of Ghent, Belgium. Published by: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
12. Makridis P., Bergh Q., Skjermo J. and Vadstein O. 2002. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia* Metanauplii to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International* 9: 225-235.
13. Mamane, H., Bohrerova, Z., and Linden, K. (2009). Evaluation of *Bacillus* Spore Survival and Surface Morphology Following Chlorine and Ultraviolet Disinfection in Water. *Journal of Environmental Engineering*, 135(8): 692-699.
14. Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 15(5): 443-452.
15. Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Salminen S., Bylund G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229-236.
16. Patra S.K. and Mohamed K.S. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the

Optimization of enrichment method for *Artemia urmiana* nauplii with probiotic bacteria (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus rhamnosus*)

Tukmechi A ^{1*}, Manaffar R ², Noori F ³

¹ Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

² Department of

* Corresponding author: a.tukmachi@urmia.ac.ir

Abstract

Artemia is a good vector for transferring nutrient substances and different compound such as drugs, etc, into the aquatic larvae. The aim of this study was to optimize the enrichment method of *Artemia urmiana* nauplii with two probiotic bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus subtilis*. For the same purpose, at first stage, the effects of different salinities, temperature, and number of bacteria on enrichment of *Artemia* were studied. In the next stage, the best concentration of probiotics for enrichment of *Artemia* nauplii on the basis of first stage observation was investigated. The result obtained from this study revealed that optimum conditions, such as salinity, temperature, time intervals for addition of bacteria and number of probiotics are 30 ppt, 32°C, 6 h and 10⁶ CFU/ml for *Lactobacillus rhamnosus* and 40 ppt, 28°C, 9 h and 10⁷ CFU/ml for *Bacillus subtilis*, respectively. The result obtained from this study revealed that optimum conditions, depend on bacterial type was alter. On the basis of these findings, we conclude that in order to obtain maximum enrichment of a particular probiotic specific enrichment conditions must be provided.

Key words: *Artemia urmiana*, Enrichment, Probiotic, Optimization