غنی‌سازی آرتمیا، *Artemia franciscana* با استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی باسیلوس

سعید ضیایی نژاد*

گروه شیلات،دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران، صندوق پستی:۴۷۱۸۹-۶۳۶۱۶

تاریخ دریافت: ۲۸ خرداد ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۱۶ مهر ۱۳۹۳

چکیده

در این تحقیق توانایی غنی‌سازی ناپلی آرتمیا (*Artemia franciscana*) با دو پروبیوتیک باسیلوس در دو مکانیسم غنی‌سازی، کپسوله شدن زیستی و اتصال به سطح بدن، مورد بررسی قرار گرفت. پروبیوتیک‌های مورد آزمایش *Bacillus subtilis* و *B.lecheniformis* بود که در دو غلظت (10^3 و 10^6 سلول در هر میلی لیتر) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو سویه باکتری توانستند به‌طور موفقیت‌آمیزی درون آرتمیا کپسوله شوند و هم به سطح بدن آرتمیا بچسبند. برای تمام تیمارها، با گذشت زمان فرآیند غنی‌سازی تعداد باکتری‌های چسبیده به آرتمیا افزایش یافت درحالیکه تعداد پروبیوتیک‌های کپسوله شده درون آرتمیا کاهش یافت. با استفاده از 10^6 سلول باکتریایی در هر میلی لیتر، سطح باکتری‌های متصل شده به آرتمیا برای باکتری*B.subtilis* به $2/3 \pm 0/2 \times 10^3$ CFU/nauplius و برای*B.lecheniformis* به $3/2 \pm 0/1 \times 10^3$ CFU/nauplius رسید. زمانیکه ناپلی‌ها در معرض باکتری‌های پروبیوتیکی به میزان 10^6 سلول در میلی‌لیتر قرار گرفتند، بیشترین سطح کپسوله شدن، برای باکتری*B.subtilis*، $4/2 \pm 0/2 \times 10^3$ CFU/nauplius و برای باکتری*B.lecheniformis*، $4/1 \pm 0/2 \times 10^3$ CFU/nauplius بود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، آرتمیا فرانسیسکانا، غنی‌سازی، کپسوله شدن زیستی، باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس لشنیفورمیس.

* عهده‌دار مکاتبات (✉)، zbsaeed@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌هادر آبزی‌پروری به سرعت در حال گسترش است. این ترکیبات که کاملاً در مقابل آنتی بیوتیک‌ها یا مواد پاد زیست قرار می‌گیرندعبارت‌اند از "مکمل غذایی میکروبی زنده است که از طریق بهبود بالانس میکروبی روده تاثیرات سودمندی بر روی میزبان دارد" (Fuller, 1989).

چندین روش برای استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری وجود دارد و مسلماً موفقیت استفاده از آن‌هامستقیماً با انتخاب بهترین روش در ارتباط است. به نظر می‌رسد در پرورش لارو آبزیان، بویژه اگر هدف از استفاده پروبیوتیک بهبود رشد و شرایط تغذیه باشد، بهترین مسیر برای رسانش 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 دهان آن‌ها باز می‌شود، 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).

یکی از کاربردهای ناپلی آرتمیا ، غنی‌سازی آن با پروبیوتیک‌ها و تلقیح دستگاه گوارش ارگانیسم هدف (آبزی پرورشی) از این طریق می‌باشد (Gomez-Gil *et al*., 1998). از این ویژگی آرتمیا حتی می‌توان جهت رویارویی آبزیان با سویه‌هاییماری‌زا از طریق خوراکی استفاده نمود (Vine *et al*., 2006).

در مطالعات مختلف با استفاده از فرآیند کپسول‌دار کردن زیستی از آرتمیا به عنوان حامل جهت رسانش باکتری‌های پروبیوتیکی به مراحل لاروی جانوران آبزی یا تلقیح دستگاه گوارش از این باکتری‌هااستفاده شده است (Venkat *et al*., 2004; Ziaei-Nejad *et al*., 2006). Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸) نیز کپسول‌دار شدن زیستی دو باکتری مختلف در آرتمیا (*A.franciscana*) را بررسی نمودند که نشان از قابلیت بالای آرتمیا در این زمینه دارد.

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. ناپلی زنده آرتمیا پتانسیل خوبی برای این هدف دارد، زیرا می‌تواند باکتری‌ها را بخورند (Makridis and Vadstein, 1999) و به عنوان حامل به کار گرفته شود (Planas *et al*., 2004). این امر در ماهی (لارو ماهی توربت: Garcia-de-la-Banda *et al*., 1992 ; لارو ماهی هالیبوت: Makridis *et al*., 2001) و در میگو (میگوی ببری سیاه :Rengpipat *et al*., 1998a; میگوی بزرگ آب شیرین: Venkat *et al*., 2004; میگوی سفید هندی:Ziaei-Nejad *et al*., 2006) به اثبات رسیده است.

به علاوه کاربرد موفقیت آمیز پروبیوتیک‌های باکتریایی از طریق آرتمیا در پرورش لارو آبزیان که با بهبود رشد و بازماندگی همراه بوده است در چندین تحقیق گزارش شده است (Rengpipat *et al*., 1998a,b; Ziaei-Nejad *et al*., 2006; Immanuel *et al*., 2007). کاربرد دیگر کپسوله کردن زیستی باکتری‌ها درون آرتمیا استفاده از آن جهت رویارویی خوراکی لاروها با باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد.

همانگونه که Chair و همکاران (۱۹۹۴) باکتری بیماری‌زای *Vibrio anguillarum* را با آرتمیا کپسول دار نموده و از آن جهت رویارویی لارو ماهی توربوت استفاده کردند. به هر حال کلونی‌سازی و غنی نمودن آرتمیا با باکتری‌ها ممکن است دو مسیر داشته باشد، این عمل ممکن است به‌طور خارجی از طریق اتصال به سطح بدن آرتمیا اتفاق بیافتد یا ممکن است به‌طور داخلی از طریق پدیده خورده شدن باکتری صورت پذیرد (Grisez *et al.*,1996). گومز-گیل و همکاران (۱۹۹۸a) کپسول دار شدن زیستی دو باکتری مختلف در آرتمیا (*A.franciscana*) را بررسی نمودند، اما آن‌ها سهم هر کدام از مسیرهای فوق جهت غنی‌سازی را جدا ننمودند. در مطالعه دیگریVine و همکاران (۲۰۰۴) تنها توانایی اتصال پروبیوتیک‌ها به سطح بدن آرتمیا را بررسی نمودند. بیان شده است که اتصال باکتری‌ها به غذاهای زنده تحت تأثیر چندین عامل از جمله روش آماده‌سازی و مرحله متابولیکی پروبیوتیک‌ها می‌باشد.

با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت موضوع، این تحقیق با هدف بررسی فرآیند غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک‌ها و تعیین عوامل موثر در این فرآیند انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تخم‌گشایی آرتمیا

در این بررسی از سیست *A.franciscana* (شرکت صیدانه پرور، ایران) استفاده گردید. سیست‌ها بر اساس روش Sorgeloos و همکاران (۱۹۷۷) کپسول زدایی گردید. سیست‌های کپسول‌زدایی شده در شوری ۳/۵ درصد، دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰ لوکس نور تحت شرایط استریل (استفاده از آب استریل و هوادهی از طریق هم زدن مکانیکی) همانگونه که Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸) شرح داده‌اند، تخم گشایی گردیدند. جهت اطمینان از استریل شدن ناپلی‌های تولیدی، دو آنتی بیوتیک کلرآمفینیکل(۳۰ میلی‌گرم در لیتر) و تری متوپریم (۴۰ میلی‌گرم در لیتر) به آب محیط تخم گشایی سیست‌ها افزوده شد. ناپلی‌های در شرایط کاملاً استریل برداشت گردیدند و با آب استریل چندین بار به طور کامل شستشو داده شدند تا آنتی بیوتیک‌های استفاده شده خارج گردند. برای کنترل اینکه آیا پس از شستشو آنتی‌بیوتیکی باقی مانده است یا خیر؟ از آزمایش انتشار صفحه‌ای (disk diffusion) روی محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده شد. در این آزمایش باکتری‌های *Escherchia coli* ، *Vibrio harveyi* ،*B.subtilis* و *B.lecheniformis* به عنوان باکتری‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفتند و عدم حضور منطقه بازدارنده رشد در اطراف دیسک‌ها نشان دهنده عدم وجود مواد آنتی بیوتیکی در نظر گرفته شد.

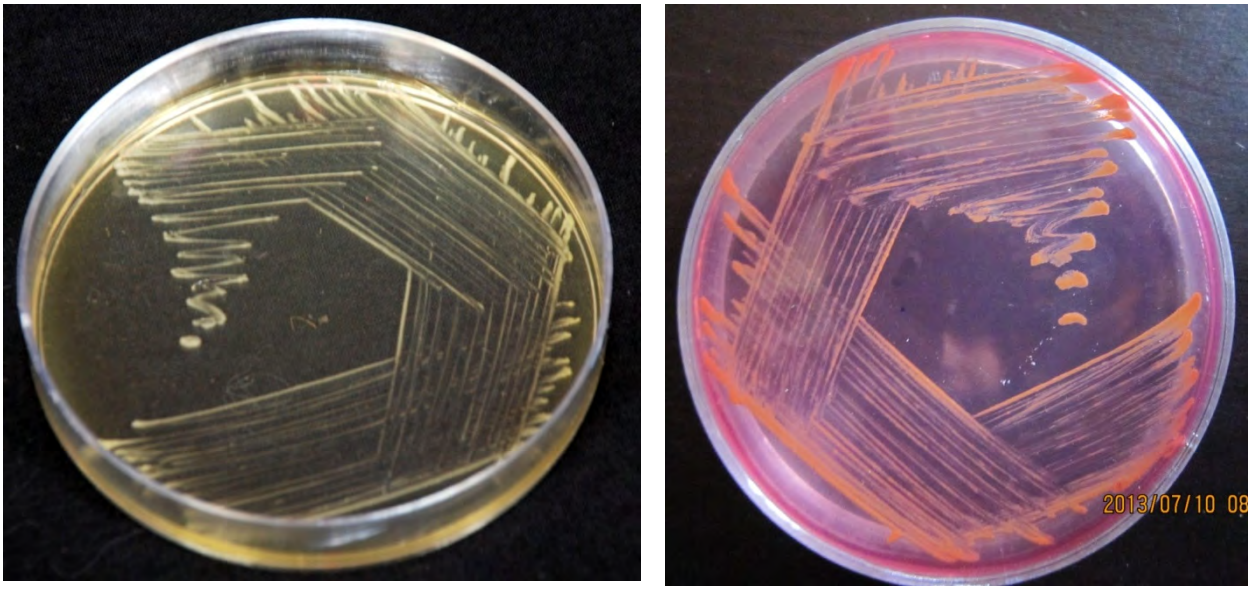
باکتری‌های مورد استفاده

در این تحقیق از دو باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* و *B.lechiniformis* استفاده گردید (شکل ۱).

فرآیند غنی‌سازی

ناپلی آرتمیا با تراکم ۵۰ ناپلی در هر میلی لیتر در ظروف شیشه‌ای ۱ لیتری در معرض سوسپانسیون باکتریایی (آب دریای استریل و باکتری مورد نظر) قرار گرفتند. هر باکتری با دو غلظت متفاوت (10^3 و 10^6 سلول باکتری در هر میلی لیتر) به عنوان تیمارهای

مختلف در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای Bs3 و Bs6 که به ترتیب 10^3 و 10^6 سلول باکتری جداسازی شده *B.subtilis* در هر میلی‌لیتر به محیط غنی‌سازی افزوده شد و تیمارهای Bl3 و Bl6 که به ترتیب 10^3 و 10^6 سلول باکتری جداسازی شده *B.lecheniformis* در هر میلی لیتر به محیط غنی‌سازی افزوده شد. تیمار شاهد (C) هیچگونه پروبیوتیکی دریافت ننمود. کلیه تیمارها با ۳ تکرار انجام شدند.



شکل ۱: باکتری *Bacillus lecheniformis*(سمت راست) وباکتری *Bacillus subtilis*(سمت چپ) مورد استفاده در این تحقیق

شیوه نمونه‌گیری

نمونه‌گیری در زمان‌های ۲، ۶، ۱۰ و ۲۴ ساعت پس از شروع فرآیند غنی‌سازی انجام گرفت. نمونه‌های آرتمیا (تقریباً ۵۰۰۰ ناپلی) با آب دریای استریل به آرامی شستشو داده شدند، تا باکتری‌هایی که به آرتمیا متصل نشده‌اند، خارج شوند و سپس ناپلی‌ها در ۵۰ میلی لیتر آب دریای استریل قرار داده شدند. جهت جدا نمودن و سنجش باکتری‌هایی که به سطح خارجی بدن آرتمیا متصل شده‌اند، بر اساس روش Vine و همکاران (۲۰۰۶) ناپلی‌ها در یک حمام سونیکاتور (پاراسونیک، شرکت پارس نهند) به مدت ۱۰ دقیقه تحت فرکانس ۴۰±۵ KHz قرار گرفتند. در این شرایط کلیه باکتری‌هایی که به سطح خارجی بدن آرتمیا متصل شده‌اند، بدون اینکه آرتمیا بمیرد، از آن جدا می‌شوند.

ناپلی‌ها از حمام سونیکاتور خارج شد و آب باقی مانده که حاوی باکتری‌های روی سطح بدن آرتمیا بود پس از رقیق‌سازی سریالی روی محیط‌های کشت *Bacillus* agar کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. کلونی‌های شمارش شده نشان دهنده تعداد باکتری‌های متصل شده به سطح بدن آرتمیا (CFU/nauplii) بود.

جهت سنجش تعداد باکتری‌هایی که توسط آرتمیا خورده شده بودند یا همان باکتری‌های کپسوله شده زیستی، ناپلی‌ها پس از گذراندن مرحله قبل به خوبی با

بنزالکونیوم کلراید (۰/۱ درصد) و آب استریل شسته شدند (Gatesoupe, 1999; Ziaei-nejad *et al.*, 2006) و با فرو بردن در آب سرد استریل کشته شدند. ناپلی‌ها در هموژنایزر شیشه‌ای هموژن شده و پس از رقیق‌سازی در محیط‌های کشت ذکر شده در بالا کشت داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

میانگین داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون چند دامنه دانکن در سطح۵ درصد با هم مقایسه گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو باکتری *B.subtilis* و *B.lecheniformis* قادرند با موفقیت به آرتمیا متصل شوند و یا درون آرتمیا به‌طور زیستی کپسوله شوند (شکل‌های۲ و۳). مشاهده شد که به عنوان یک روند کلی در کلیه تیمارها با گذشت زمان تعداد باکتری‌های کاندید متصل شده به آرتمیا افزایش می‌یابد، درحالی‌که تعداد باکتری‌های درون آرتمیا کاهش می‌یابد. در تیمار شاهد هیچ پروبیوتیکی چه به صورت متصل شده به آرتمیا و چه به صورت کپسوله شده درون آرتمیا دیده نشد.

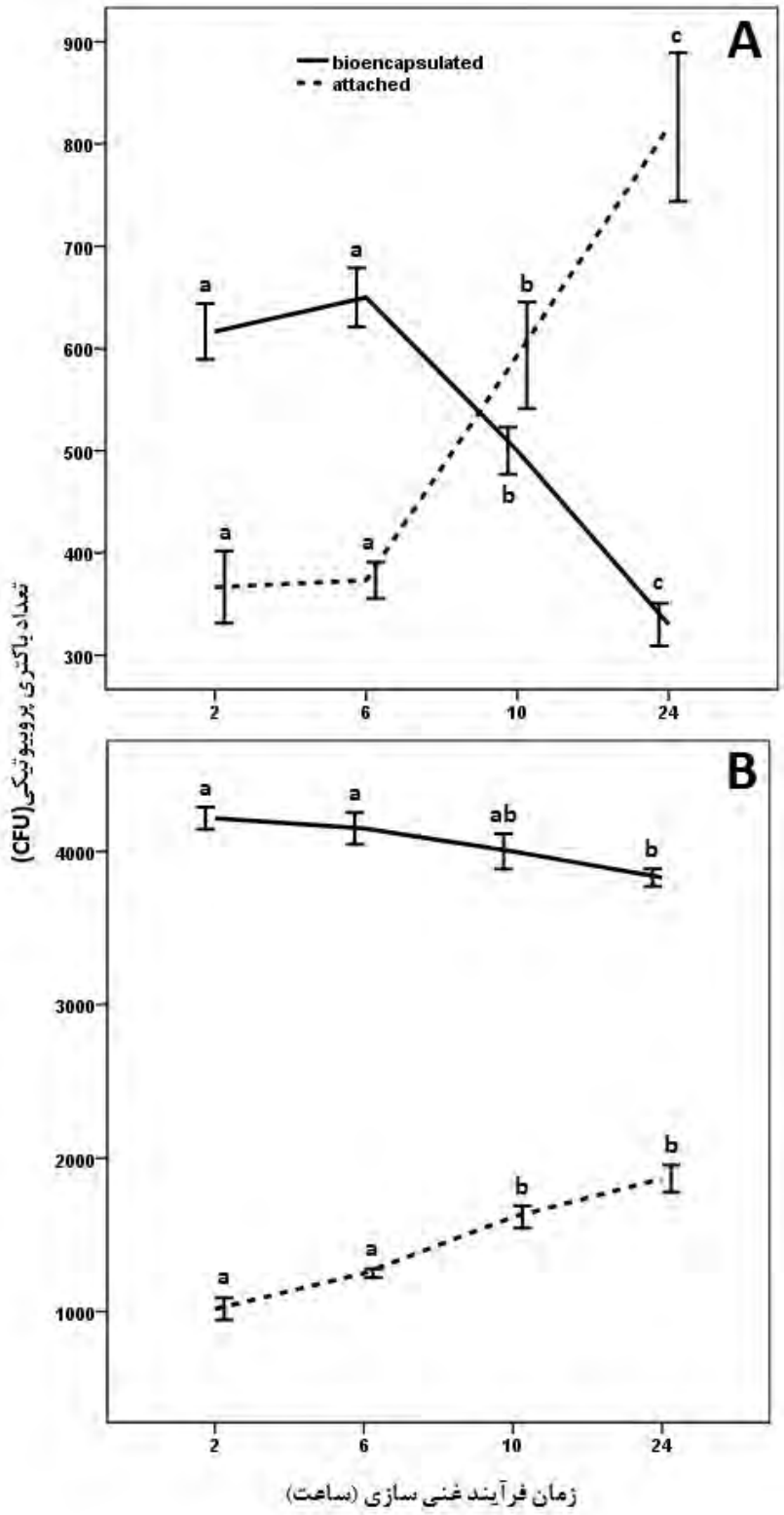
در کلیه آزمایش‌ها با باکتری جداسازی شده *B.subtilis* (هر دو تیمار Bs3 و Bs6) تعداد باکتری کپسوله شده درون آرتمیا پس از ۶ ساعت به سرعت کاهش پیدا نمود، درحالی‌که از ۲ ساعت تا ۶ ساعت تقریباً ثابت ماند. در تیمار Bs3 که cells/ml $۱۰^{۳}$ باکتری *B.subtilis* به محیط غنی‌سازی افزوده شد، بعد از گذشت ۲ ساعت از شروع فرآیند غنی‌سازی CFU/nauplii $۱۰^{۲}\times۰/۲\pm۶/۱$ مشاهده گردید و پس از ۶ ساعت میزان باکتری کاهش یافت تا در ۲۴ ساعتبه CFU/nauplii $۱۰^{۲}\times۰/۲\pm۳/۲$ رسید. در تیمار Bs6 که تعداد باکتری به cells/ml $۱۰^{۶}$ افزایش داده شد، در زمان ۲ ساعت CFU/nauplii $۱۰^{۳}\times۰/۱\pm۴/۲$ درون آرتمیا کپسوله شد که به دنبال آن به CFU/nauplii $۱۰^{۳}\times۰/۱\pm۳/۸$ در زمان ۲۴ ساعت کاهش یافت.

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که الگوی اتصال باکتری‌ها به آرتمیا کاملاً برخلاف الگوی کپسوله شدن در آرتمیا است و تعداد باکتری‌های متصل شده به آرتمیا با گذشت زمان افزایش یافت. این الگوهای افزایشی از زمان ۲ ساعت تا ۲۴ ساعت در تمام آزمایش‌ها با هر دو باکتری *B.subtilis* و *B.lecheniformis* مشاهده گردید.

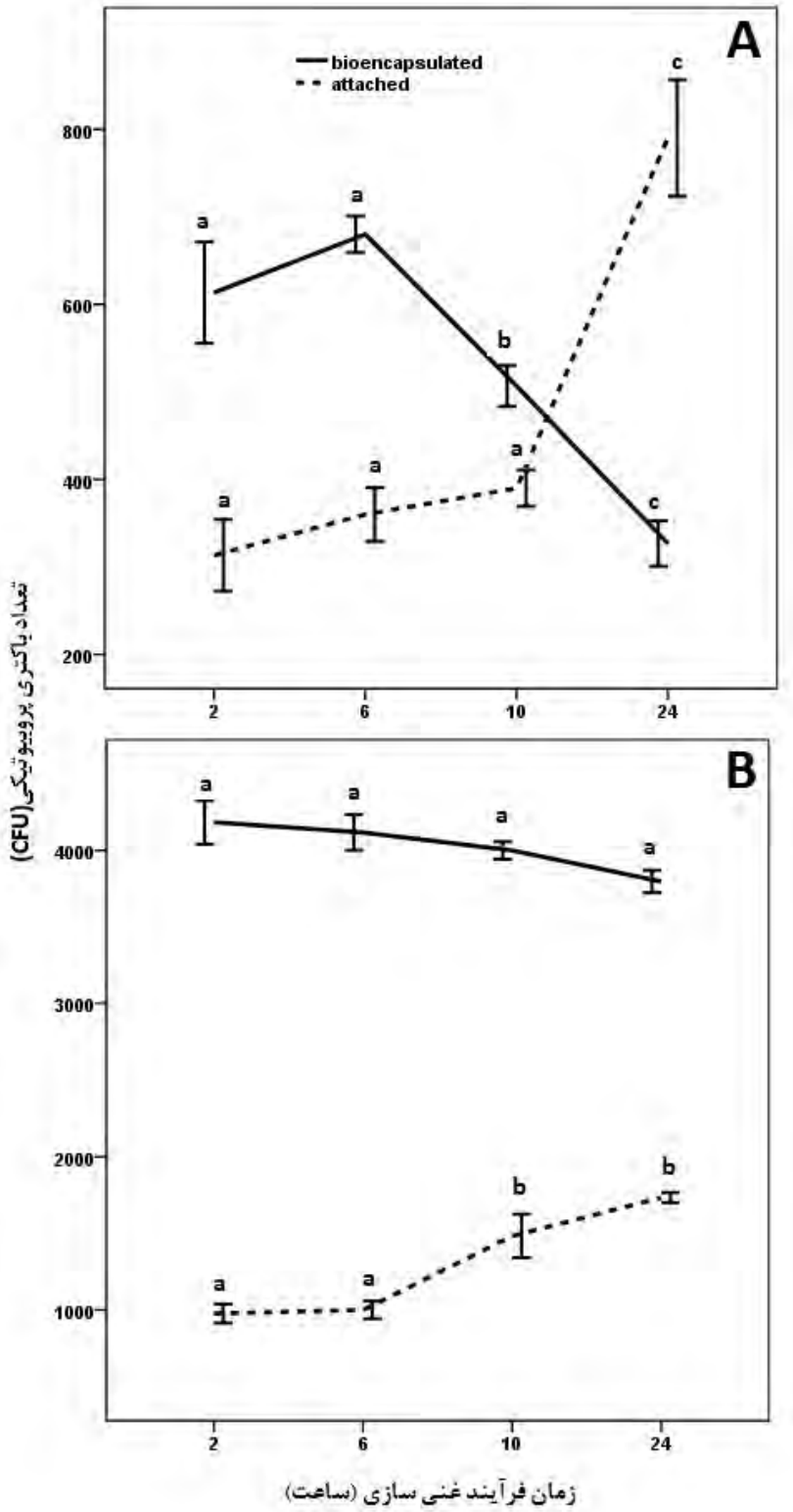
در تیمار Bs3 باکتری‌های متصل شده به آرتمیا از CFU/nauplii $۱۰^{۲}\times۰/۳\pm۳/۶$ در زمان ۲ ساعت به CFU/nauplii $۱۰^{۲}\times۰/۴\pm۸/۰$ در زمان ۲۴ ساعت افزایش یافت.

زمانی‌که از باکتری *B.subtilis* به میزان cells/ml $۱۰^{۶}$ استفاده شد(تیمار Bs6)، کارایی اتصال باکتری‌ها به آرتمیا در مقایسه با تیمار Bs3 افزایش یافت($p<۰/۰۵$). تعداد باکتری‌های متصل شده به آرتمیا در تیمار Bs6 از CFU/nauplii $۱۰^{۳}\times۰/۱\pm۱/۰$ در زمان ۲ ساعت به CFU/nauplii $۱۰^{۳}\times۰/۱\pm۱/۸$ در زمان ۲۴ ساعت افزایش یافت.

آزمایش‌هایی که با باکتری *B.lecheniformis* انجام گرفت. الگوهای مشابهی را در مقایسه با باکتری *B.subtilis* نشان دادند.



شکل۲: تعداد باکتری جداسازی شده *B.subtilis* که در هر دو تیمار Bs3(شکل A) و Bs6(شکل B) به سطح بدن آرتمیا متصل شده‌اند و یا درون آرتمیا کپسول‌دار شده‌اند.در هر نقطه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است.



شکل ۳: تعداد باکتری جداسازی شده B.lecheniformis که در هر دو تیمار Bl3(شکل A) و Bl6(شکل B) به سطح بدن آرتمیا متصل شده‌اند و یا درون آرتمیا کپسول‌دار شده‌اند. در هر نقطه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است.

بحث

نتایج نشان داد که باکتری‌های کاندید به خوبی می‌توانند آرتمیا را غنی‌سازی نمایند (هم با اتصال به آرتمیا و هم با کپسوله شدن درون آن) و به‌طور کلی می‌توان اینگونه بیان نمود که در مورد این باکتری‌ها از شیوه غنی‌سازی آرتمیا می‌توان مقادیر مناسبی از آن‌ها را در اختیار لاروها قرار داد.

در مورد استفاده غنی‌سازی آرتمیا جهت رسانش پروبیوتیک‌ها باید توجه نمود که در پرورش لاروی آبزیان سن غذای زنده تأثیر به سزایی در موفقیت این دوره دارد. ناپلی آرتمیا در ۶ الی ۸ ساعت ابتدایی پس از تخم‌گشایی از منابع انرژی ذخیره‌ای خود استفاده می‌نماید، بنابراین نیازی به منابع غذایی خارجی ندارد (Lavens and Sorgeloos, 1996; Sorgeloos *et al*., 1998). در این مدت زمانی ناپلی آرتمیا کوچک‌ترینانداره و به علت انرژی بالای ذخیره‌ای خود بیشترین ارزش غذایی را برای لاروها دارند (Sorgeloos *et al*., 2001). بنابراین این مسئله از اهمیت خاصی برخوردار است که غنی‌سازی در همین مدت زمان ۶ الی ۸ ساعته پس از تخم‌گشایی صورت پذیرد. همچنین در این آزمایش نشان داده شد که هر دو باکتری *B.subtilis* و *B.lecheniformis*قادرند در همین بازه زمانی به خوبی آرتمیا را غنی نمایند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بعد از این بازه زمانی نیز غنی‌سازی آرتمیا موفقیت‌آمیز است، به به این دلیل که از آرتمیای پر انرژی تری برای تغذیه لاروها استفاده می‌گردد، بنابراین می‌توان توصیه نمود که مناسب‌ترین زمان برای غنی‌سازی آرتمیا با باکتری‌های *B.subtilis* و *B.lecheniformis* ، ۶-۲ ساعت پس از گذشت انکوباسیون می‌باشد. بدین طریق این امکان ایجاد می‌شود که تعداد کافی از باکتری‌های *B.subtilis* و *B.lecheniformis*در اختیار لارو ماهیان دریایی قرار گیرد. گزارش‌های متعددی نیز در زمینه استفاده موفقیت‌آمیز از آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک‌ها در زمینه پرورش لاروی آبزیان منتشر شده است (Venkat *et al*., 2004, Ziaei-Nejad *et al*., 2006). آنچه مهم است این نکته می‌باشد که از این طریق می‌توان به خوبی دستگاه گوارش لارو آبزیان را با باکتری‌های مفید کلونی‌سازی نمود و تعادل میکروبی آن و در نتیجه رشد و بازماندگی را بهبود بخشید.

بیان شده است که تغذیه لاروهای میگوی ببری سیاه با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus* S11 زمان تکامل لاروی را کوتاه‌تر می‌نماید و بازماندگی را افزایش می‌دهد (Rengpipat *et al*., 1998a). به طور مشابهی، Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۶) بعد از تغذیه لاروهای میگوی سفید هندی *F.indicus* با آرتمیای غنی‌سازی شده با پروبیوتیک *Bacillus spp.* بازماندگی بالاتر و فعالیت بیشتر آنزیم‌های گوارشی را مشاهده نمودند. به علاوه Venkat و همکاران (۲۰۰۴) رشد و ضریب تبدیل غذایی بهتری را در لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین که با آرتمیای غنی‌سازی شده با باکتری پروبیوتیکی *L.sporogenes* تغذیه شده بودند گزارش دادند. در مورد لارو ماهیان نیز نشان داده شده که تغذیه دو پروبیوتیک تجاری باکتوسل (*Pediococcus acidilactici*) و لیووسل (*Saccharomyces cerevisiae*) به لارو ماهی *P.pollachius* از طریق آرتمیا باعث بهبود رشد شده است (Gatesoupe, 2002).

همانگونه که قبلاً اشاره شد، به نظر می‌رسد فرآیند غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک‌ها دارای دو مسیر باشد. یکی پروبیوتیک‌هایی که به سطح خارجی بدن آرتمیا متصل می‌شوند و دیگر پروبیوتیک‌هایی که درون آرتمیا کپسوله می‌شوند. هر چند در شرایط عملی هر دو دسته از پروبیوتیک‌ها، چه آن‌هایی که به آرتمیا متصل شده‌اند و چه آن‌هایی که در آرتمیا کپسوله شده‌اند، در نهایت به آبزی هدف خواهند رسید و از لحاظ عملی تفکیک آن‌ها جندان مهم نیست، اما به نظر می‌رسد برای اینکه درک بهتری از فرآیند غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک‌ها ایجاد شود، لازم است سهم هر کدام از این مسیرها در فرآیند غنی‌سازی مشخص گردد. در این تحقیق سعی شد که سهم هر کدام از این مسیرها و عوامل مؤثر بر غنی‌سازی بررسی شود.

همانگونه که نتایج نشان داد تعداد باکتری‌های کپسوله شده درون آرتمیا به شدت به عواملی مانند مدت زمان غنی‌سازی، نوع باکتری و تراکم باکتری در محیط غنی‌سازی بستگی دارد. Gomez-Gilو همکاران (۱۹۹۸) نیز تأیید نموده‌اند که تجمع باکتری درون آرتمیا به نوع باکتری مورد استفاده، زمان در معرض قرار گرفتن آرتمیا و وضعیت باکتری (زنده یا مرده بودن آن) بستگی دارد.

اگر چه به نظر می‌رسد پایداری باکتری‌های متصل شده به آرتمیا، به علت اینکه این باکتری‌ها ممکن است در اثر عواملی مثل شستشو جدا شوند، کمتر از باکتری‌های کپسوله شده درون آرتمیا است. اما همانگونه که Vine و همکاران (۲۰۰۶) بیان نموده‌اند توانایی اتصال باکتری‌ها به عنوان یک معیار انتخاب باکتری‌های کاندید برای پروبیوتیک شدن باید مورد توجه قرار گیرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هر دو باکتری کاندید دارای توانایی خوبی جهت اتصال به آرتمیا هستند. بیشترین تعداد باکتری متصل شده به آرتمیا برای باکتری *B.subtilis* و باکتری *B.lecheniformis* در تیماری که 10^6 cells/ml باکتری استفاده گردید، مشاهده شد. این نتایج مشابه آن چیزی است که Gomez-Gilو همکاران (۱۹۹۸) به‌دست آورند. هر چند این محققین تراکم بالاتری از باکتری را در محیط غنی‌سازی استفاده نمودند (10^8 cells/ml)، اما بیشترین تعداد باکتری متصل شده به آرتمیا را $4/55\times10^3$ CFU/nauplii گزارش دادند. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که میزان باکتری متصل شده به آرتمیا به نوع باکتری، زمان فرایند غنی‌سازی، تراکم باکتری در محیط غنی‌سازی و مرحله رشد باکتری بستگی دارد. نوع باکتری تأثیر مهمی در پتانسیل اتصال باکتری‌ها دارد، به گونه‌ای که Santos و همکاران (۱۹۹۱) توانایی اتصال باکتری‌ها را به ساختار سطح باکتری مربوط دانسته‌اند. هرچند به نظر می‌رسد ساختار و شرایط سطحی که باکتری باید به آن متصل شود نیز در فرآیند اتصال تأثیر گذار می‌باشد. Vine و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که اتصال باکتری به موجودات غذای زنده تحت تأثیر عواملی مانند فلور میکروبی موجود در غذای زنده ، روش آماده سازی و مرحله متابولیکی باکتری و محیط انکوباسیون غذای زنده و باکتری مورد نظر (شرایط محیط غنی‌سازی) می‌باشد.از سوی دیگرBlum و همکاران (۱۹۹۹) بیان نمودند که توانایی اتصال باکتری‌ها در مرحله سکون رشد بیشتر از مرحله رشد لگاریتمی است. مشخص شده است که تغییر مرحله رشد باکتری *L.salivarius* در شرایط *In vitro* از مرحله رشد اولیه به رشد لگاریتمی و بعد به

مرحله سکون با افزایش تولید یک پروتئین ۸۴ کیلودالتونی که در توانایی اتصال در این شرایط دخیل است همراه می‌باشد (Kelly *et al*., 2005).

در مطالعه‌ای کهZiaei-nejad(۲۰۱۰) انجام داد نشان داد هر دو باکتری *B.subtilis* و *B.lecheniformis* توانستند با حذف رقابتی سایر باکتری‌ها از جمله ویبریوها بخش قابل توجهی از کل فلور میکروبی آب را به خود اختصاص دهند. همچنین ثابت شده است که افزودن تعداد زیادی از باکتری پروبیوتیکی *Lactobacillus brevis* به آب محیط پرورش آرتمیا می‌تواند تعدا باکتری*Vibrio spp* را کاهش دهد (Villamil *et al*., 2003). از این‌رو بر اساس قابلیت این گونه پروبیوتیک‌ها در حذف رقابتی عوامل بیماری‌زا می‌توان پیشنهاد نمود که پروبیوتیک‌ها ممکن است کاربرد خوبی به عنوان یک عامل کنترل کننده بیولوژیک داشته باشند.

آنچه از نتایج این تحقیق بر می‌آید اینکه هر دو باکتری باسیلوس مورد آزمایش هم تواناییخوبی برای اتصال به آرتمیا و هم توانایی کپسوله شدن در آرتمیا را دارند. این توانایی بخشی به بیولوژی سلول‌های باسیلوس و بخشی به طبیعت فیلترکنندگی غیرانتخابی آرتمیا به عنوان یک غذای زنده برمی‌گردد.لذا این امکان میسر است که از آرتمیا به عنوان 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. پرورش دهندگان مخصوصاً پرورش دهندگان میگو و ماهیان دریایی که با لاروهای ریزی سروکار دارند، معمولاً جهت استفاده و رسانش پروبیوتیک‌ها به لاروها دچار سردرگمی و مشکل می‌باشند. نتایج این تحقیق مسلماً خواهد توانست راهگشای بخش خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی و میگو باشد.

سپاسگزاری

لازم است از حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان در قالب طرح پژوهشی جهت انجام این تحقیق تشکر گردد.

منابع

1. Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin M., Collins, K., Morelli, L., 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. Trends in Food Science and Technology10, 405-410.
2. Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Nelis, H., Sorgeloos, P., De Leenheer, A. P., 1994. An oral challenge for turbot larvae with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture International., 2, 270–272.
3. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animal. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-378.
4. Garcia de la Bande, I., Chereguini, O., Rasines, I., 1992. Influence of lactic bacterial additives on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae culture. Boletin del instituto Espanol de Oceanografia, 8,247-254.
5. Gatesoupe, F.J., 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*, Aquaculture, 212, 347–360.
6. Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Abreu-Grobois,F.A., Roque, A., 1998a. Bioencapsulation of two different Vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appllied Environmental Microbiology, 64, 2318–2322.
7. Grisez, L., Chair,M., Sorgeloos, P., Ollevier,F., 1996.Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of. Aquatic Organisms. 26, 181–187.
8. Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interaction in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology, 38, 1–26.

9. Immanuel, G., Citarasu, T., Sivaram, V., Michael Babu, M., Palavesam, A., 2007 . Delivery of HUFA, probionts and biomedicine through bioencapsulated Artemia as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesity in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. Aquacult International, 15,137–152.
10. Kelly, P., Maguire, P.B., Bennett, M., Fitzgerald, D.J., Edwards, R.J., Thiede, B., Treumann, A., Collins, J.K.O.,Sullivan, G.C., Shanahan, F., Dunne, C., 2005. Correlation of probiotic *Lactobacillus salivarius* growth phase with its cell wall-associated proteome. FEMS Microbiology Letters, 252, 153–159.
11. Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production of livefood for aquaculture.FAO, Rome, Italy, 295 pages
12. Makridis, P., Vadstein, O., 1999.Food size selectivity of *Artemia franciscana* at three developmental stages. Journal of Plankton Research, 21, 2191–2201.
13. Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J., Vadstein, O., 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in Artemia metanauplii to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International. 9, 225–235.
14. Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Perez-Lomba, R., Gonzalez, M.P., Murado, M., 2004.Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture 240, 313-329.
15. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Sirirat, R., Wannipa, P., Somkiat, P., Piamsak, M., 1998a. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313.
16. Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul,S., Menasveta,P., 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel T.W.(ed).Advances in shrimp biotechnology.National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,177-181.
17. Santos, Y., Bandin, I., Nieto, T.P., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1991. Cell surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. Aquatic Animal Health 3, 297-301.
18. Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavin˜a,E., Baeza-Mesa,M.,Persoone, G., 1977. Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture, 12, 311.
19. Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P.H., Merchie, G., Lavens, P., 1998. Use of Brine Shrimp, *Artemia* spp., in Larval Crustacean Nutrition: A Review. Reviews in Fisheries Science. 6, 55-68.
20. Sorgeloos, P., Dhert, P.H., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture, 200, 147-159.
21. Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man).Aquaculture Research35, 501-507.
22. Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B., 2003.Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture, 219, 43-56.
23. Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T., 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27, 319–326.
24. Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser H., 2006. Probiotics inmarine larviculture. FEMS MicrobiologyReview. 30, 404–427.
25. Ziaei-Nejad, S., Habibi-Rezaei, M., Azari-Takami, G., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A. & Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus spp*. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252, 516-524.
26. Ziaei-Nejad, S., 2010. Screening of probiotic bacteria from yellowfin seabream (Acanthopagrus latus) gastrointestinal tract and investigating their effects on growth and survival indices of the fish. PhD thesis in Aquaculture. Tehran University, 220 pages