دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

گروه منابع طبیعی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته تکثیر و پرورش آبزیان

غنی سازی آرتمیا پارتنوژنتیکا (*Artemia parthenogenetica*) با باسیلوس های گرم مثبت جهت ارتقاء معیارهای رشد، تغذیه و نرخ بقاء در لارو قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پژوهش و نگارش

هادی جمالی

استاد راهنما

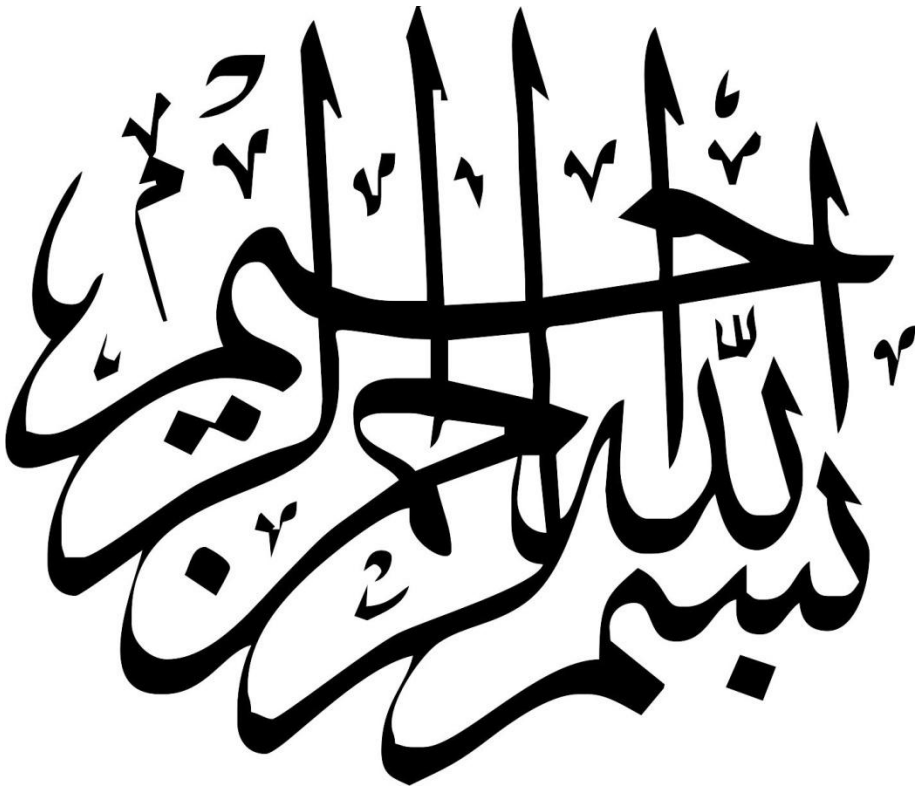
حجت الله جعفریان

اساتید مشاور

رحمان پاتیمار

مهدی سلطانی

۱۳۹۱


بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

گروه منابع طبیعی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته تکثیر و پرورش آبزیان

غنی سازی آرتمیا پارتنوژنتیکا (*Artemia parthenogenetica*) با باسیلوس های گرم مثبت جهت ارتقاء معیارهای رشد، تغذیه و نرخ بقاء در لارو قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پژوهش و نگارش

هادی جمالی

استاد راهنما

حجت الله جعفریان

اساتید مشاور

رحمان پاتیمار

مهدی سلطانی

۱۳۹۱

تقدیم به

شهدای هسته ای ایران

که تقدیر حقیقی جهان درکف مردانی است که پروای نام ندارند.

پدر و مادر عزیزم

که محبت‌های آسمانی‌شان از شماره بیرون است گر چه هر دستی از جبران زحمات بی‌دریغشان ناتوان است

آنان‌که توانشان رفت تا به توانایی برسم

مویشان سپید گشت تا سپید روی بمانم

کوشیدند تا بیاسایم و رنج کشیدند تا بیارامم

برادران و خواهر عزیزم

به پاس زحمات بی‌دریغشان

صبر و بردباریشان تکیه‌گاهم و تداوم سایه‌هایشان آرزویم

و استاد گرامی دکتر عبدالمجید حاجی مرادلو

که از نگاهشان صلابت، از رفتارشان محبت و از صبرشان ایستادگی را آموختم

سپاس

خداوند را هر دم تا مادام عمرم شاکرم که خانواده ای به من اعطا نمود که همچون کوهی استوار در تمامی مراحل مرا یاری نموده و مستحکمترین دیوار برای اتکاء من در لحظات سخت زندگی‌ام اند.

جا دارد در اینجا تشکر خالصانه خود را از استاد محترم راهنما، جناب آقای **د کتر حجت الله جعفریان** که با تلاش‌های بی‌کران خود مرا در به انجام رساندن این مرحله از زندگی‌ام یاری نمودند، ابراز دارم و خداوند را برای شاگردی ایشان شکر کنم. از اساتید گرانقدر جناب آقای **دکتر رحمان پاتیمار و** جناب آقای **دکتر مهدی سلطانی** برای مشاوره در این تحقیق کمال تشکر را دارم.

قدردان زحمات کلیه اساتید و کارمندان **دانشگاه گنبد کاووس** و ارادت بی پایان خود را نسبت به تمامی دوستانم **مهندسین بهلکه، عبداللهی، خدایی، مرادی، حسن پور، آدینه، سهندی، علی زاده، فرصتی، احدی زاده** و **دهقان** که دوران تحصیلی‌ام را به شیرین‌ترین دوران تبدیل کردند، ابراز داشته و از همگی سپاسگزارم.

چکیده

به منظور آشکار نمودن توانایی باسیلوس های پروبیوتیکی و تاثیرات آنها بر پارامترهای رشد و تغذیهای، درصد بقا، میزان تحمل در برا پتستهای محیطی و سطوح ترشح ازت آمونیاکی و اوره لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، یک آزمایش تغذیه ای ۳۰ روزه در ماهی قزل آلای رنگین کمان با تغذیه از ناپلی آرتمیا پارتنوژنتیکای (*Artemia parthenogenetica*) غنی شده در سوسپانسیون پنج گونه باسیلوس های پروبیوتیکی در مقادیر ۱×۱۰^{۸}، ۲×۱۰^{۸} و ۳×۱۰^{۸} (واحد کلنی در هر لیتر) از سوسپانسیون غنی سازی انجام شد. در تیمارهای شاهد لاروهای قزل آلای رنگین کمان از آرتمیا پارتنوژنتیکای بدون غنی سازی تغذیه کردند. در این تحقیق لاروها ۴ نوبت در روز و به میزان ۳۰ درصد وزن بدن تغذیه شدند. بعد از یک دوره آزمایش ۳۰ روزه، تمامی لاروهای موجود در هر یک از حوضچه ها جهت زیست سنجی و تعیین رشد، نمونه برداری صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد فاکتورهای رشد و تغذیه مانند وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب رشد حرارتی (TGC)، نرخ وزن نسبی بدست آمده (RGR)، نسبت کارایی پروتئین(PER)، نسبت کارایی انرژی(EER) و همچنین کارآیی تبدیل غذا (FCE) به طور معنیداری در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). ضریب تبدیل غذا (FCR) در تیمارهای آزمایشی به طور معنیداری بهبود یافت ($P< ۰/۰۵$). در مقایسه با تیمار شاهد درصد بقاء لاروها در تیمارهای آزمایشی در حد معنیداری افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). همچنین در تیمارهای آزمایشی لاروها در برابر استرسهای محیطی در حد معنی داری مقاومت بیشتری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ($P< ۰/۰۵$). آمونیاک و اوره ترشحی نیز در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد در حد معنیداری کاهش یافت ($P< ۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: آرتمیا پارتنوژنتیکا، باسیلوس ، قزل آلای رنگین کمان، رشد، تغذیه

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه	
۱- مقدمه.....	2
۱-۱- کلیاتی در مورد تحقیق	2
۱-۱-۱ – پروبیوتیکها	2
۱-۱-۲- غنی سازی	4
۱-۱-۳- تلقیح باکتری های پروبیوتیکی به دستگاه گوارش لارو ماهی	5
۱-۳- اهمیت موضوع و اهداف	7
فصل دوم: کلیات و سوابق تحقیق	9
۲-۱- سوابق تحقیق	10
۲-۱-۱- ایران	10
۲-۱-۲- خارج از کشور	11
فصل سوم: مواد و روشها	14
۳- مواد و روشها	15
۳-۱- مواد مورد استفاده	15
۳-۱-۱- سیست آرتمیا پارتنوژنتیکا	15
۳-۱-۲ – پروبیوتیکهای مورد استفاده	15
۳-۱-۳- آنتی بیوتیک ها و مواد ضدعفونی کننده	16
۳-۱- ۴- محیط های کشت باکتری وترکیبات شیمیایی برای تست های بیوشیمیایی	16

۳-۱- ۵- مواد غیر مصرفی	16
۳-۲- روش ها	17
۳-۲-۱- شناسایی و کشت خالص باسیلوسهای پروبیوتیکی	17
۳-۲- ۲- تخم گشایی سیست های آرتمیا و تولید ناپلی استریل	17
۳-۲- ۳- جدا سازی و شمارش ناپلی ها و انتقال آنها به ظروف غنی سازی	18
۳-۲-۴- آماده سازی پروبیوتیک ها	19
۳-۲-۴-۱- فعال سازی اسپور باسیلوس های پروبیوتیکی و تبدیل آنها به باکتری های رویشی	19
۳-۲-۴- ۲- شمارش کلنی های باسیلوس ها	19
۳-۲- ۵- غنی سازی ناپلی آرتمیا با پروبیوتیک ها	20
۳-۲-۶- لاروهای قزل آلا	20
۳-۲- ۷- طرح آزمایش	21
۳-۲-۸- تیمارهای غنی سازی ناپلی آرتمیا	21
۳-۲-۹- فعال سازی اسپور باسیلوس های پروبیوتیکی	22
۳-۲-۱۰- غنی سازی ناپلی آرتمیا با باسیلوس های پروبیوتیکی	22
۳-۲-۱۱- جدا سازی ناپلی های غنی شده جهت تغذیه لاروهای قزل آلای رنگین کمان	22
۳- ۲-۱۲- جمع آوری ناپلی های خورده نشده	23
۳-۲-۱۳- اندازه گیری معیارهای کیفی آب	23
۳-۲-۱۴- آزمایشات باکتریایی لاروهای ماهی	23
۳-۲-۱۵-زیست سنجی لاروهای ماهی	25
۳-۲-۱۶- فاکتورهای رشد	25
۳-۲-۱۶-۱- نرخ رشد ویژه (SGR)	25
۳-۲-۱۶-۲- فاکتور وضعیت (CF)	25
۳-۲-۱۶-۳- ضریب رشد حرارتی (TGC)	25
۳-۲-۱۶-۴- نرخ وزن نسبی بدست آمده (RGR)	26
۳-۲-۱۶-۵- شاخص هپاتوسوماتیک (HSI)	26
۳-۲-۱۶-۶- شاخص ویسروسوماتیک (VIS)	26
۳-۲-۱۶-۷- تولید خالص ماهی (BWI)	26

۳-۲- ۱۷- تجزیه شیمیایی لاشه لارو قزل آلای رنگین کمان و ناپلی آرتمیا جهت تعیین ترکیبات مغذی آن.....	27
۳-۲- ۱۸- فاکتورهای تغذیه ای	27
۳-۲- ۱۸-۱- ضریب تبدیل غذایی (FCR).....	28
۳-۲-۱۸-۲- کارآیی تبدیل غذا (FCE).....	28
۳-۲-۱۸-۳- ارزش تولید پروتئین (PPV).....	28
۳-۲-۱۸-۴- ارزش تولید چربی (LPV).....	28
۳-۲-۱۸-۵- نسبت کارآیی پروتئین (PER).....	28
۳-۲-۱۸-۶- نسبت کارآیی چربی (LER).....	29
۳-۲-۱۸-۷- انرژی بدست آمده (EG).....	29
۳-۲-۱۸-۸- پروتئین بدست آمده (PG).....	29
۳-۲-۱۸-۹- چربی بدست آمده (LG).....	29
۳-۲-۱۹- تست مقابله در برابر عوامل استرس زا	30
۳-۲-۲۰- اندازه گیری میزان ازت آمونیاکی مترشحه توسط لاروهای ماهی در آب.....	30
۳-۲-۲۱- روش آماری وشیوه نمونه برداری	31
فصل چهارم: نتایج	32
۴- نتایج	33
۴-۱- اثرباسیلوسهای الحاقی برمعیارهای رشد لاروهای قزل آلای رنگین کمان.....	33
۴-۱-۱- وزن نهایی	34
۴-۱-۲- طول نهایی	34
۴-۱-۳- نرخ رشد ویژه	34
۴-۱-۴- فاکتور وضعیت	34
۴-۱-۵- ضریب رشد حرارتی	35
۴-۱-۶- تولید خالص ماهی	35
۴-۱-۷- نرخ وزن نسبی بدست آمده	35
۴-۱-۸- شاخص هپاتوسوماتیک	35
۴-۱-۹- شاخص ویسروسوماتیک	36

۴-۱-۱۰- بقا	36
۴-۱-۱۱- رگرسیون بین پارامترهای رشد لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی.....	36
۴-۲- اثر باسیلوسهای الحاقی بر ترکیب مواد مغذی لاشه در لاروهای قزل آلای رنگین کمان.....	37
۴-۲-۱- پروتئین خام	38
۴-۲-۲- چربی خام	38
۴-۲-۳- انرژی خام	38
۴-۲-۴- ماده خشک	38
۴-۲-۵- رگرسیون بین ترکیبات شیمیایی بدن لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی	38
۴-۲-۶- ضرایب همبستگی بین ترکیب بیوشیمیایی لاشه و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی.....	40
۴-۳- اثر باسیلوسهای الحاقی بر معیارهای تغذیه ای در لاروهای قزل آلای رنگین کمان.....	41
۴-۳-۱- ضریب تبدیل غذایی	42
۴-۳-۲- کارآیی تبدیل غذا	42
۴-۳-۳- نسبت کارایی پروتئین	43
۴-۳-۴- نسبت کارایی چربی	43
۴-۳-۴- نسبت کارایی انرژی	43
۴-۳-۵- پروتئین، انرژی و چربی بدست آمده	43
۴-۳-۶- ارزش تولید پروتئین و چربی	43
۴-۳-۷- رگرسیون بین پارامترهای تغذیه لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی.....	44
۴-۴- نتایج حاصل از میزان مقاومت لاروها در برابر عوامل استرس زا.....	44
۴-۴-۱- پی اچ قلیایی	45
۴-۴-۲- پی اچ اسیدی	46
۴-۴-۳- شوری	46
۴-۴-۴- آمونیاک	47
۴-۴-۵- دما	48
۴-۴-۶- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروهای قزل آلای رنگین کمان در مقابله با عوامل استرس زا و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی	49
۴-۵- ترکیبات نیتروژنه مترشحه	52

۴-۵-۱- آمونیاک مترشحه	53
۴-۵-۲- اوره مترشحه	53
۴-۵-۳- انرژی تلف شده بر اساس اوره و آمونیاک مترشحه	53
۴-۵-۴- رگرسیون بین اوره و آمونیاک مترشحه لاروهای قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی	54
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	57
۵- بحث	58
۵-۱- اهمیت غنی سازی آرتمیا با پروبیوتیک ها وکاربرد آن در آبزی پروری	58
۵-۲- باسیلوس های پروبیوتیکی و ضرورت مدیریت میکروبی	59
۵-۳- متابولیسم لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان	60
۵-۴- تاثیر باسیلوسهای پروبیوتیکی بر ارتقاء عملکرد رشد و تغذیه	60
۵-۵- نقش باسیلوسهای پروبیوتیکی بر نرخ بقاء لاروهای قزل آلای رنگین کمان	65
۵-۶- تجزیه شیمیایی لاشه	67
۵-۷- مقاومت در برابر عوامل تنش زا	68
۵-۸- میزان ترشح ازت آمونیاکی	70
۵-۹- نتیجه گیری	71
۵-۱۰- پیشنهادات	73
۵-۱۰-۱- پیشنهادات پژوهشی	73
۵-۱۰-۲- پیشنهادات اجرایی	73
منابع	74

فهرست جداول و اشکال

عنوان	صفحه
جدول ۳-۱- غلظت هر یک از گونه های باسیلوس در مخلوط های باکتریایی آکوا	16
جدول ۴-۱- اثرباسیلوسهای الحاقی برمعیارهای رشد لاروهای قزل آلای رنگین کمان	33
جدول ۴-۱-۱۱- رگرسیون بین پارامترهای رشد لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی	36
جدول ۴-۲- آنالیز لاشه اولیه لارو ماهی قزل آلا و آرتمیا پارتنوژنتیکا	37
جدول ۴-۳- آنالیز لاشه لارو ماهیان تغذیه شده از آرتمیای پارتنوژنتیکا	37
جدول ۴-۴- پارامترهای تغذیه ای لارو ماهی قزل آلای تغذیه گردیده با ناپلی آرتمیا پارتنوژنتیکای غنی شده با باسیلوس های پروبیوتیکی	41
جدول ۴-۳-۷- رگرسیون بین پارامترهای تغذیه لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان و غلظت باسیلوس های پروبیوتیکی	44
جدول ۴-۵- مقادیر ترشحات نیتروژنی لارو ماهی قزل آلای تغذیه گردیده با ناپلی آرتمیا پارتنوژنتیکای غنی شده با باسیلوس های پروبیوتیکی	52
شکل ۴-۱- رگرسیون بین پروتئین خام لاشه لاروها و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	39
شکل ۴-۲- رگرسیون بین چربی خام لاشه لاروها و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	39
شکل ۴-۳- رگرسیون بین ماده خشک لاشه لاروها و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	40
شکل ۴-۴- رگرسیون بین انرژی ناخالص لاشه لاروها و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	40
شکل ۴-۵- تغییرات ضرایب همبستگی بین ترکیب لاشه لارو قزل آلا و مقادیر باسیلوس در سوسپانسیون غنی سازی	41
شکل ۴-۶- تغییرات زمان زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در مقابله با استرس پی اچ قلیایی	45
شکل ۴-۷- تغییرات زمان زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در مقابله با استرس پی اچ اسیدی	46
شکل ۴-۸- تغییرات زمان زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در مقابله با استرس شوری	47
شکل ۴-۹- تغییرات زمان زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در مقابله با استرس آمونیاک	48
شکل ۴-۱۰- تغییرات زمان زنده مانی لارو قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف در مقابله با استرس دما	49

شکل ۴-۱۱- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروها در مقابله با استرس پی اچ قلیایی و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	50
شکل ۴-۱۲- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروها در مقابله با استرس پی اچ اسیدی و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	50
شکل ۴-۱۳- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروها در مقابله با استرس شوری و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	51
شکل ۴-۱۴- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروها در مقابله با استرس آمونیاک و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	51
شکل ۴-۱۵- رگرسیون بین زمان زنده مانی لاروها در مقابله با استرس دما و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	52
شکل ۴-۱۶- رگرسیون بین آمونیاک مترشحه لارو قزل آلا و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	54
شکل ۴-۱۷- رگرسیون بین اوره مترشحه لارو قزل آلا و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	55
شکل ۴-۱۸- رگرسیون بین انرژی تلف شده بر اساس آمونیاک مترشحه لارو قزل آلا و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	55
شکل ۴-۱۹- رگرسیون بین انرژی تلف شده بر اساس اوره مترشحه لارو قزل آلا و مقادیر باسیلوس های بکار رفته در سوسپانسیون غنی سازی	56

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- کلیاتی در مورد تحقیق

۱-۱-۱ – پروبیوتیک ها

تعریف

سال ها پیش از کشف پروبیوتیک ها، از میکروب ها بطور ناخودآگاه به منظور نگهداری مواد غذایی استفاده می شد و این روش تجربی در بهبود سلامتی انسان مشارکت داشت. واژه پروبیوتیک از دو کلمه یونانی pro و biosis به معنی "برای حیات" گرفته شده است و امروزه جهت نامگذاری باکتری های دارای اثرات مفید بر انسان ها و حیوانات استفاده می شود. با این حال، تعریف پروبیوتیک ها در طول زمان توسعه یافته است. تلاش های اولیه جهت استفاده از آنها به عنوان نوعی ماده میکروبی که سبب تحریک رشد میکروارگانیزم ها می شوند (لی لی و استیل ول[1]، ۱۹۶۵) یا عصاره های بافتی که سبب بهبود رشد باکتری ها می شوند، عمومیت پیدا نکرد. پارکر[2] (۱۹۷۴) برای اولین بار واژه پروبیوتیک را در زمینه مکمل های جیره غذایی حیوانات بکار برده و آن را چنین تعریف نمود:

"پروبیوتیک ها، ارگانیزم ها یا موادی هستند که در تعادل میکروبی روده نقش دارند".

فولر[3] (۱۹۸۹) با حذف واژه "مواد" که ممکن بود شامل آنتی بیوتیک ها و مواد محرک باکتریایی شود، تعریف جدیدی از پروبیوتیک ها را بیان داشت:

باکتری های زنده ی مکمل غذایی که با بهبود تعادل میکروبی روده اثرات سودمندی بر میزبان دارند. این تعریف اصلاح شده، بر مکمل غذایی تشکیل شده از باکتری های زنده تأکید دارد و بهترین تعریف پذیرفته شده در رابطه با پروبیوتیک هاست (این تعریف مواد تهیه شده به عنوان پروبیوتیک و نیز ماست های سنتی و مواد غذایی تخمیر شده را نیز در بر می گیرد).

گرم[4] و همکاران (۱۹۹۹) بیان داشتند که پروبیوتیک هر نوع مکمل میکروبی زنده است که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی بر میزبان دارند (در این تعریف اتصال به غذا مدنظر نمی باشد). به علاوه، سالمینن[5] و همکاران (۱۹۹۹) پروبیوتیک را به عنوان هر نوع ترکیب میکروبی (اما نه الزاماً زنده) یا سلول

[1] - Lily and Stillwell
[2] - Parker
[3] - Fuller
[4] - Gram
[5] - Salminen

های میکروبی با تأثیرات مفید بر سلامتی میزبان معرفی کردند (در این تعریف نیاز به وجود سلول های زنده جهت اتصال به ذرات غذایی نادیده گرفته شده است).

در آبزی پروری برای اولین بار یاسودا و تاگا [۶] (۱۹۸۰) پیش بینی کردند که باکتری هایی یافت خواهند شد که نه تنها به عنوان غذا بلکه به عنوان کنترل کننده های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال کننده های چرخه مواد غذایی مفید می باشند. براساس مشاهدات مبنی بر توانایی میکروارگانیزم ها در اصلاح ترکیب باکتریایی آب و رسوبات، موریارتی[۷] و همکاران (۱۹۹۸) پیشنهاد بسط تعریف پروبیوتیک ها را به " افزودنی های تک یاخته ای به آب " بیان داشتند، که با ایده کنترل بیولوژیکی که توسط مائدا [۸] و همکاران (۱۹۹۷) ارائه گردیده است هماهنگی دارد. گاتسوپ[۹] (۱۹۹۹) تعریفی دیگر از پروبیوتیک ها در آبزی پروری ارائه نمود: سلول های تک یاخته ای که از طریق ورود به لوله گوارشی میزبان و قابلیت زنده ماندن، و با هدف بهبود سلامتی مورد استفاده قرار می گیرند. این تعریف بر مصارف خوراکی پروبیوتیک و قابلیت آن در بهبود سلامتی میزبان به جهت حضور در لوله گوارشی تأکید دارد و از جامع ترین تعاریف پروبیوتیک ها در رابطه با آبزی پروری می باشد.

نهایتاً تأکید بر این است که طبق نظر فولر (۱۹۸۹) پروبیوتیک ها باید دارای اثرات سودمند در بدن میزبان بوده همچنین قادر به زنده ماندن در لوله گوارش، ازدیاد در مقیاس انبوه و ادامه حیات برای مدت زمان طولانی به هنگام نگهداری باشند. همچنین باید در محدوده وسیع دمایی و شوری کارایی داشته باشند (فولر، ۱۹۸۹).

با وجود اینکه مکانیسم عملکرد پروبیوتیک ها مشخص نشده اما احتمالاتی شامل دفع رقابتی پاتوژن ها وجود دارد، یعنی پروبیوتیک ها از طریق آنتی بیوزیس یا رقابت برای مواد مغذی و یا جایگاه های اتصال، تغییر متابولیسم باکتری ها و یا با تحریک سیستم ایمنی بدن مانع کلونیزه شدن پاتوژن ها در لوله گوارش میزبان می شوند. پروبیوتیک ها همچنین از طریق تولید ویتامین ها، ترکیبات مسمومیت زدا در جیره و تجزیه ذرات غیر قابل هضم تحریک اشتها و بهبود تغذیه در میزبان را به دنبال دارند. شواهد بسیاری مبنی بر مؤثر بودن پروبیوتیک ها در ممانعت از محدوده ی وسیعی از پاتوژن های ماهیان وجود دارد ولی دلایل این بازدارندگی بیان نشده است. جهت انتخاب یک پروبیوتیک بالقوه، معیارهایی از جمله پایداری فنوتیپی و ژنوتیپی، تحمل اسید و نمک های صفراوی، چسبیدن به اپیتلیوم روده، تولید مواد ضد میکروبی علیه عوامل بیماری زای شناخته شده، پایداری طی مراحل تولید و ذخیره سازی باید مورد توجه قرار گیرد. در زمینه آبزی پروری پروبیوتیک ها را می توان به دو صورت استفاده کرد (ایریانتو و آستین[۱۰]، ۲۰۰۲)

---

[6] - Yasuda and Taga
[7] - Moriarty
[8] - Maeda
[9] - Gatesoupe
[10] - Irianto and Austin

۱ – معرفی سویه انتخابی به دستگاه گوارش از طریق غذای زنده (آرتمیا، روتیفر) و یا از طریق غذای غیر زنده (پلت خشک)

۲ – افزودن باکتری های خاص به آب محیط پرورشی

۱-۱-۲- غنی سازی

آرتمیا گسترش جهانی دارد و سویه های جغرافیایی متنوعی از آن در دنیا وجود دارد. نقش بارز آرتمیا در توسعه صنعت آبزی پروری جهانی یک حقیقت انکار ناپذیر است. در بین مواد غذایی زنده ای که برای تغذیه لارو ماهیان دریایی، ماهیان آب شیرین و سخت پوستان به کار می رود ناپلی تازه تفریخ شده آرتمیا عمدتاً به دلیل ارزش غذایی بالا، سهولت دسترسی، تنوع اشکال کاربردی آن در مراحل مختلف رشد و پرورش انواع آبزیان و قابلیت استفاده از آن به عنوان حامل مناسب ویتامین ها، رنگدانه ها، مواد شیمیایی، واکسن ها و هورمون ها همگی باعث گردیده تا این ارگانیسم از جایگاه ویژه ای در آبزی پروری برخوردار باشد و روز به روز بر اهمیت و دامنه استفاده از آن افزوده شود (بنگستون[11] و همکاران، ۱۹۹۱). آرتمیا توانایی انتقال انواع مواد مختلف در مقادیر و دوزهای مختلف را به آبزیان دارد، به طوری که بوسیله غنی سازی می توان از آلودگی آب محیط پرورش جلوگیری کرد، بسیاری از مواد غنی کننده مانند اسیدهای چرب، ویتامین ها و آنتی بیوتیک ها دارای نیمه عمر مفیدند و پس از مدتی در آب بی اثر شده و موجب آلودگی آب می شوند همچنین بسیاری از مواد به سرعت در آب ته نشین می شوند ولی در صورت استفاده از آرتمیا در غنی سازی ماده مورد نظر از اتلاف این مواد جلوگیری شده و مواد تا ذره آخر مصرف می شوند (قربانی، ۱۳۸۶).

در بین غذاهای زنده، ناپلی آرتمیا به عنوان برترین غذای زنده تشخیص داده شده است و به علت وجود مواد مغذی فراوان در ناپلی آرتمیا به صورت گسترده در پرورش لارو ماهیان دریایی و هچری های سخت پوستان استفاده می شود (لاون و سورجلوس [12]، ۱۹۸۶). ناپلی آرتمیا قادر به تغذیه از باکتری ها بوده و تعداد باکتری های تجمع پیدا کرده در خلال فرآیند غنی سازی بستگی به غلظت سوسپانسیون باکتری و گونه های باکتری به کارگیری شده دارد (گومزگیل [13]، ۱۹۹۸). ناپلی غنی شده به عنوان غذای زنده در تغذیه لاروهای آبزیان دریایی به صورت یک حامل عمل کرده و باعث انتقال پروبیوتیک ها به دستگاه گوارش آبزی مورد پرورش گردیده و می تواند جمعیت باکتریایی آنها را در جهت مطلوب تغییر دهند (ماکریدیس [14]، ۲۰۰۱). ناپلی

[11] - Bengston
[12] - Laven and Sorgeloos
[13] - Gomez- Gil
[14] - Makridis

آرتمیا در مدیریت غذایی آبزیان، عموما به عنوان یک حامل برای انتقال ترکیبات مختلف شیمیایی مورد آزمایش برای لارو ماهیان (چیر[15] و همکاران ، ۱۹۹۱) مطرح بوده و غنی سازی آرتمیا با باکتری ها در واقع فرآیندی است که در طی آن شرایطی مهیا می گردد تا این ارگانیزم نه تنها به عنوان یک غذای زنده بلکه به عنوان یک حامل برای تلقیح واکسن های خوراکی و باکتری ها به ماهیان در مراحل لاروی آنها استفاده گردد (ماکریدیس، ۲۰۰۱). آرتمیا از جمله موجودات زنده ای است که در طی فرآیند غنی سازی، می تواند به عنوان حامل مواد مختلفی نظیر انواع ترکیبات مغذی (واتاناب[16] و همکاران ۱۹۸۳)، عوامل ضد میکروبی (دیکسون[17] و همکاران، ۱۹۹۵)، انواع واکسن ها (کامپبل[18] و همکاران، ۱۹۹۳)، پروبیوتیک ها و ترکیبات تحریک کننده سیستم ایمنی به منظور افزایش مکانیسم دفاعی میزبان (گلتسوپ، ۱۹۹۴) مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از آرتمیا به عنوان حامل مواد ضد باکتریایی در بسیاری از مطالعات صورت گرفته است (مانی[19]، ۱۹۹۰؛ چیر، ۱۹۹۱؛ نلیز[20]، ۱۹۹۱؛ ورپریت[21]، ۱۹۹۲؛ گاپاسین[22]، ۱۹۹۶). تکنیک غنی سازی آرتمیا در مطالعات از دو ساعت (گاپاسین، ۱۹۹۶) تا ۳۲ ساعت (توراکی[23]، ۱۹۹۱؛ ۱۹۹۵) گزارش شده است. گومز-گیل و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند بهترین زمان برای غنی سازی آرتمیا ۱ الی ۸ ساعت می باشد و بیش از آن باعث دفع مواد توسط ناپلی آرتمیا می شود.

۱-۱-۳- تلقیح باکتری های پروبیوتیکی به دستگاه گوارش لارو ماهی

در بدو تفریخ، دستگاه گوارش عاری از هرگونه آلودگی است اما اندکی پس از آن لارو در معرض تماس با محیط و غذای زنده قرار می گیرد که این مورد منجر به تشکیل کلنی توسط باکتری های مختلف می شود (رینگو[24] و همکاران، ۱۹۹۶). تعادل باکتریایی متأثر از عوامل متعددی از قبیل غذا، خصوصیات فیزیولوژیک ماهی و فاکتورهای ایمنی شناختی می باشد. حضور فلور طبیعی در روده به عنوان مکمل آنزیم های گوارشی تلقی شده و در شرایط طبیعی به صورت سدی در برابر تهاجم عوامل بیماری زا عمل می نماید. باکتری های پروبیوتیکی موفق به چسبیدن به مخاط روده قادرند در روده تشکیل کلنی دهند. باکتری های پروبیوتیکی متصل می توانند با اشغال مکان های اتصال مانع استقرار و تشکیل کلنی عوامل بیماری زا مثل باکتری های کولیفرم و

15 - Chair
16 - Watanabe
17 - Dixon
18 - Campbell
19 - Mohney
20 - Nelis
21 - Verpraet
22 - Gapasin
23 - Touraki
24 - Ringo

کلستریدیا شده و در نتیجه مانع از ایجاد عفونت های روده ای شوند (واین [۲۵] و همکاران، ۲۰۰۴). استقرار میکروفلور طبیعی روده ای را می توان به عنوان مکملی برای سیستم گوارشی و در شرایط طبیعی به عنوان سدی بر علیه تهاجم عوامل بیماری زا در نظر گرفت. لارو ماهی می تواند مقادیر قابل توجهی باکتری بخورد. میکروفلور تخم یقیناً تشکیل کلنی (کلنیزاسیون) اولیه لارو ماهی را تحت تأثیر قرار می دهد (ور شوئر[۲۶] و همکاران، ۲۰۰۰). خوردن باکتری ها و سایر میکروارگانیسم ها به ویژه پس از تغذیه اولیه در مرحله کیسه زرده باعث استقرار فلور میکروبی اولیه در روده آنها می شود که این فلور میکروبی به صورت توالی تا زمان بلوغ جانور و استقرار و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش ادامه می یابد. از این رو افزودن پروبیوتیک بلافاصله بعد از تخم گشایی به منظور اشغال وکلنی سازی روده لاروها قبل از معرفی غذای زنده بسیار حائز اهمیت است (رینگو و وادستین، ۱۹۹۸). مهم ترین راه جهت ورود باکتری های بیماری زا و همچنین پروبیوتیک ها به د اخل بدن لاروهای ماهی در تفریخ گاه ها، از طریق طعمه زنده (غذای زنده) می باشد. به عنوان یک اقدام پیش گیرانه در برابر آلودگی ها، ممکن است از طریق غنی سازی غذاهای زنده و یا مکمل سازی جیره های ماهی با پروبیوتیک ها، باکتری های بیمار ی زا کنترل گردند (پلاناس[۲۷] و همکاران، ۲۰۰۴). روده لارو ماهیان دریایی سریعا توسط باکتری های محیطی درخلال روزهای اول زندگی بعد از تخم گشایی اشغال می گردد. این اجتماعات اولیه کلنی شده در روده لاروهای ماهی ممکن است در مراحل اولیه زندگی لاروهای ماهی در رقابت با باکتری هایی که به عنوان پروبیوتیک معرفی می گردند، به یک برتری رقابتی دست یابند، لذا تلقیح باکتری های پروبیوتیکی همزمان با جذب کیسه زرده از طریق اضافه نمودن به آب محیط پرورشی و در هنگام شروع تغذیه فعال از طریق غذای زنده بایستی صورت گیرد (وادستین[۲۸] و همکاران ، ۱۹۹۳؛ هانسن و اولافسن [۲۹]، ۱۹۹۹).

[25] - Vine
[26] - Verschuere
[27] - Planas
[28] - Vadstein
[29] - Hansen and Olafsen

۱-۲- اهمیت موضوع و اهداف

ماهی قزل آلای رنگین کمان با دارا بودن قابلیت سازگاری مناسب، در اکثر آب های شیرین که دارای دمای مناسب جهت رشد این گونه هستند، یافت می شود (نفیسی بهابادی، ۱۳۸۵). براساس آمار منتشر شده توسط سازمان خواروبار جهانی(FAO)، ایران در پرورش آزاد ماهیان در سال ۲۰۰۹ دارای رتبه سوم و در پرورش قزل آلای رنگین کمان در آب شیرین دارای رتبه اول جهان می باشد. از این رو این گونه به عنوان یک گونه در ایران اقتصادی مطرح می باشد و عفونت های باکتریایی به نظر می رسد ، یکی از دلایل کاهش سطح تولید در مزارع پرورشی این ماهی باشد (کاپتانوئیک[۳۰] و همکاران، ۲۰۰۵). موفقیت یا شکست در برنامه های آبزی پروری وابسته به شرایط پرورشی لاروهای ماهی می باشد. به عبارت دیگر عفونت های ناشی از باکتری ها در شرایط پرورشی ممکن است باعث افزایش مرگ و میر و کاهش تولید شود (باقری و همکاران، ۲۰۰۸). از سویی دیگر برای توقف یا کاهش چنین اتفاقات نامطلوب در پرورش لاروهای ماهی ممکن است از افزودنی های خاص به غذا استفاده شود، که این امر سبب افزایش کارایی هضم یا جذب غذا می شود، در این میان، آنتی بیوتیک ها از جمله افزودنی های دارویی می باشند که از سال ۱۹۵۰ به غذاهای ماهی افزوده می شود (آهیلان[۳۱] و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به ایجاد مقاومت دارویی در میزبان که از محدویت های آنتی بیوتیک ها محسوب می گردد، اهمیت باکتری های زیست یار یا پروبیوتیکی کاملا آشکار گردید ، بطوری که باکتری های زیست یار در آبزی پروری برای کنترل بیماری ها و همچنین به عنوان مکمل هایی برای بهبود رشد لاروهای ماهی استفلده می شد. در برخی موارد نیز به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی برای لاروهای ماهی بکار گرفته می شد (ایرانتو و آستین، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳). در این آزمایش از پروبیوتیک شامل ۵ سویه از باکتری باسیلوس استفاده شد. باکتری های باسیلوس قادر به تولید پلی میکسین، باکتریو کش ها و آنتی بیوتیک ژرامایسین می باشند (چیتا [۳۲]، ۲۰۰۲). همچنین این با کتری ها ساپروفیت های گرم مثبت، غیرپاتوژن و ارگانیسم اسپوری شکل هستند که به طور طبیعی در هوا، آب، خاک، گرد و غبار و رسوبات پید ا می شوند. باسیلوس ها با ممانعت یا کاهش چسبیدن پاتوژن ها، تحریک دستگاه ایمنی میزبان و تولید اسید، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین های ضد رشد پاتوژن ها باعث کاهش تلفات در ماهیان می شوند (وازکوئز[۳۳] و همکاران، ۲۰۰۵).

جهت اجراء این پایان نامه از مخلوط فرآورده باکتریایی شرکت نیکوتک تحت عنوان تجاری پروتکسین (حاوی اسپور باسیلوسهای پروبیوتیکی) استفاده شد. این باسیلوسها با این فرض بکار گرفته شد که طی

---

30 - Kapetanovic
31 - Ahilan
32 - Chitta
33 - Vazquez