

## تأثیر باکتری پروبیوتیکی لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم بر بازماندگی، پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی آرتمیا ارومیانا

زهراء کرایی<sup>۱</sup>، علی آبرومند<sup>۱\*</sup>، سعید ضیایی نژاد<sup>۱</sup>

\* aberoumandali@yahoo.com

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۶

### چکیده

با توجه به اینکه بهبود ایمنی میزبان یکی از اساسی ترین کاربردهای استفاده از پروبیوتیک‌ها است، در این تحقیق اثر پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم بر پارامترهای بیوشیمیایی، ایمنی شناختی عصاره بدن و بقاء آرتمیا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور سیست آرتمیای ارومیه (*Artemia urmiana*) طبق روش‌های استاندارد، پوسته زدایی و تخم گشایی شد. این آزمایش در سه تیمار و با سه بار تکرار صورت گرفت که تیمارها شامل سطوح صفر (C)،<sup>(۱)</sup> CFUml<sup>۱۰۳</sup> (P3) و CFUml<sup>۱۰۶</sup> (P6) از پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم بودند. طول دوره آزمایش ۱۰ روز در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده حاکی از بهبود درصد هج، درصد بازماندگی، شاخص‌های بیوشیمیایی و نیز پارامترهای ایمنی شناختی عصاره بدن آرتمیا بود، به گونه‌ای که بالاترین درصد بازماندگی در تیمارهای حاوی پروبیوتیک با مقادیر  $90/00 \pm 3/31$  در تیمار P3 و  $93/50 \pm 1/17$  در تیمار P6 مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ( $P < 0/05$ ). پارامترهای بیوشیمیایی همچون سطح پروتئین کل، آلبومین و لیزوزم افزایش و سطح کورتیزول عصاره بدن آرتمیا کاهش یافت. علاوه بر این سطح پارامترهای ایمنی شناختی عصاره بدن آرتمیا نظیر ایمنوگلوبولین و فعالیت فنول اکسیداز به ترتیب با مقادیر  $95/60 \pm 3/50$  و  $167/76 \pm 16/16$  درصد در تیمار P6 بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داده اند. شاخص‌های دیگر همچون آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز نیز در مقادیر حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد کمتر شد که حاکی از تاثیر مثبت این پروبیوتیک بر شاخص‌های مذکور می‌باشد.

**لغات کلیدی:** پروبیوتیک، لاکتوپاسیلوس پلاتتاروم، آرتمیا، شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی شناختی

\* نویسنده مسئول

<sup>۱</sup>Colony Forming Unit/ml

**مقدمه**

گوناگون در میگوهای مختلف گزارش شده است (Rengpipat *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). Rahiman و همکاران (2010) بیان نمودند که پارامترهای اینمی در میگوی روزنبرگی تغذیه شده با پاسیلوس‌ها بطور معنی داری افزایش یافت. در مطالعه‌ای که توسط Teseng و همکاران (۲۰۰۹) صورت گرفت به بررسی اثر استفاده از پروبیوتیک پاسیلوس سابتیلیس بر ارتقای اینمی و مقاومت میگوی وانمی نسبت به بیماریزایی باکتری ویبریو پرداختند، بیان شد که اگر چه در تعداد هموسیت‌ها و انفجار تنفسی در بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت اما فعالیت فنول اکسیداز، فعالیت فاگوسیتی و قدرت باکتری کشی دارای اختلاف قابل توجهی با گروه شاهد بود. Alavandi و همکاران (۲۰۰۴) اثر باکتری‌های *Vibrio* sp. و *Pseudomonas* sp. و *fluvialis* را بر شاخص‌های اینمی میگویی مونودون بررسی نمودند. تعداد هموسیت‌ها، فعالیت فنول اکسیداز و فعالیت آنتی باکتریال مورد مطالعه قرار گرفته که در تیمارهای نام برده نسبت به شاهد دارای نتایج بهتری بود. Olmos و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که سطح گلوکز سرم در میگوهای تغذیه شده با سویاًی مکمل شده با پاسیلوس سابتیلیس نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی داری پیدا کرد. هدف از این مطالعه بررسی اثر سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس پلانتاروم بر درصد تخم گشایی و نیز درصد بازماندگی ناپلی آرتمیا و پارامترهای بیوشیمیابی و اینمی شناختی عصاره بدن آرتمیا می‌باشد.

**مواد و روش کار****طراحی و آماده‌سازی مکان تحقیق**

این تحقیق در دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء شهرستان بهبهان انجام شد. سیست آرتمیا (*Artemia urmiana*) (Lavens & Sorgeloos, 1996) به صورت کاملاً تصادفی (تراکم ۵۰ سیست در میلی لیتر) به سه تیمار شامل؛

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های بی‌ضرری هستند که موجب تحییک سلامت موجود میزبان از طریق حضور مستقیم و یا حفاظت غیر مستقیم در برابر باکتری‌های مضر می‌شوند (عبداللهی آرپناهی و همکاران، ۱۳۹۳). نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص پروبیوتیک مصرفی و روش‌های مختلف افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی به طور قابل توجهی بر خصوصیات بیوشیمیابی خون اثر می‌گذارد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۳). عبد اللهی آرپناهی و همکاران (۱۳۹۳) بیان کردند که استفاده از پاسیلوس‌های پروبیوتیکی موجب ایجاد اختلاف معنی داری در سطح گلوکز، کورتیزول و پروتئین کل و نیز پارامترهای اینمی مانند لیزوژیم و ایمونوگلوبولین در پست لاروهای میگوی پا سفید غربی شد. طبق گزارش احمدی و همکاران (۱۳۹۳) میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز، پروتئین تام و گلوبولین در میگوی وانمی تغذیه شده با پروبیوتیک پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس بطور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود.

پروبیوتیک‌ها می‌توانند عملکردهای متفاوتی بر بدن آرتمیا داشته باشند که از آن جمله می‌توان به دخالت در عمل هضم به وسیله تولید آنزیم‌های خارج سلولی، تولید ویتامین‌ها و تجزیه ترکیبات غیر قابل هضم، تولید ترکیبات ضد باکتریابی و کاهش سوبسترای موجود برای سایر جمعیت‌های باکتریابی اشاره کرد (Verschueren *et al.*, 2000). اما در مورد تاثیر پروبیوتیک بر پارامترهای بیوشیمیابی عصاره بدن آرتمیا مطالعات چندانی صورت نگرفته است. تجویز خوارکی برخی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک موجب افزایش پاسخ اینمی مانند فعالیت فاگوسیتوز، لیزوژیم، فعالیت فنول اکسیداز و سنتز سایتوکین‌ها می‌شود (Panigrahi *et al.*, 2007). فعالسازی و افزایش اینمی سلولی و همورال نظری فاگوسیتوز، فنول اکسیداز و فعالیت‌های ضد میکروبی همولنف همراه با افزایش نرخ رشد، میزان بقا و مقاومت در برابر عوامل بیماریزا در اثر تغذیه با پروبیوتیک‌ها

سبوسترا L-DOPA (Sigma) تعیین شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره بدن در پلیت‌ها قرار گرفته، سپس ۳۰ میکرولیتر از بافر کاکودیلات (CAC) و ۵۰ میکرولیتر آنزیم محرک تریپسین (۱ درصد) (sigma) اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن L-۱۳۰ میکرولیتر بافر کاکودیلات و ۵۰ میکرولیتر DOPA افزوده شده و میزان جذب در طول موج ۴۹۰ nm تخمیر خوانده شد. تشکیل DOPA-chrome پس از ۵ و ۱۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. هر واحد از فعالیت آنزیمی معادل تغییر در جذب نوری در هر دقیقه به ازای هر میلی گرم از پروتئین در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد است.

### سنجد کورتیزول و گلوکز

به منظور اندازه‌گیری میزان کورتیزول و گلوکز از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون استفاده شد.

### سنجد ایمنوگلوبولین M (IgM)

برای اندازه‌گیری IgM از روش نفلومتری استفاده گردید (Siwicki & Anderson, 1993). در این روش IgM موجود در نمونه سرم با آنتی بادی ضد محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شود.

### سنجد آلبومین و پروتئین کل

برای اندازه‌گیری آن از روش برومومکرزل گرین (BCG) (Soltani *et al.*, 2010) کالریمتری بهره گرفته شد (Doumas *et al.*, 1981).

### سنجد آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)

جهت اندازه‌گیری پارامترهای مذکور از روش رنگ سنجی سینتیک استفاده شد (Borges *et al.*, 2004).

تیمار ۱: فاقد پروبیوتیک (C)

تیمار ۲: پروبیوتیک *L. plantarum* به میزان ۱۰<sup>۳</sup> CFU/ml (P3)

تیمار ۳: پروبیوتیک *L. plantarum* به میزان ۱۰<sup>۶</sup> CFU/ml (P6) و هر تیمار در سه تکرار تقسیم شدند.

در این آزمایش از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتارتوم (شرکت دانش بنیان ارجان زیست یار) طبق تیمارهای فوق استفاده شد.

در پایان دوره پرورش (۱۰ روز) نمونه‌های همگن شده و در ۴ درجه سانتی گراد درون دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰ در دقیقه قرار گرفت. آنگاه قسمت فوکانی نمونه‌ها به منظور سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی شناختی به آزمایشگاه انتقال یافت.

### پارامترهای مورد بررسی در صد تفريخ

پس از اينکه سیستهای آرتمیا (*Artemia urmiana*) کپسول‌زدایی شدند. در صد تفريخ سیستهای کپسول زدایی شده در تیمارهای مختلف پس از طی زمان تخم گشایی طبق فرمول زير محاسبه گردید:

$$H\% = \frac{N}{N+U+E} \times 100$$

### سنجد لیزوژیم

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوژیم سرم از روش Nayak (۲۰۱۰) استفاده گردید. بدین منظور ۱۵ میکرولیتر عصاره بدن آرتمیا با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزووداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه در طول موج ۴۵۰ nm اندازه‌گیری شد.

### سنجد فعالیت فنول اکسیداز

فعالیت فنول اکسیداز با استفاده از اسپکتروفوتومتر با تشکیل رنگدانه DOPA-chrome پس از اکسیداسیون

### شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن آرتمیا

نتایج حاصل از بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر پارامترهای بیوشیمیایی عصاره بدن آرتمیا در جدول ۲ نشان داده شده است.

### گلوکز عصاره بدن ناپلی آرتمیا (mg/dl)

میزان گلوکز موجود در عصاره بدن آرتمیا در هر سه تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند اما میزان آن در تیمارهای حاوی پروبیوتیک به مراتب بالاتر از تیمار شاهد بود. بیشترین میزان گلوکز در تیمار P3 با  $427/35 \pm 10/23$  (mg/dl) و کمترین مقدار در تیمار C با  $398/14 \pm 22/23$  (mg/dl) به دست آمد.

### پروتئین، کورتیزول و آلبومین کل عصاره بدن ناپلی آرتمیا (g/dl)

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میزان پروتئین کل عصاره بدن آرتمیا در طول دوره پرورش با به کارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد بطوریکه میزان آن از  $4/20 \pm 1/62$  g/dl در گروه شاهد به  $5/60 \pm 1/10$  g/dl در تیمار P6 رسید.

بین میزان کورتیزول موجود در عصاره بدن آرتمیا در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با این وجود بالاترین میزان آن در گروه شاهد و کمترین میزان آن در تیمار P6 به دست آمد. در واقع با افزایش میزان پروبیوتیک میزان کورتیزول موجود در عصاره بدن کاهش یافت.

طبق نتایج حاصله، میزان آلبومین در تیمارهای مختلف در طول دوره آزمایش اختلاف معنی‌داری نداشت با این وجود میزان آن در تیمارهای حاوی پروبیوتیک تا حدودی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود.

### روش آنالیز آماری داده‌ها

به منظور آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر درصد هج و بازماندگی آرتمیا در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: درصد هج و بازماندگی آرتمیا تحت سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم

Table 1: Hatch percentage and survival of Artemia under different levels of *L. plantarum* probiont.

تیمار	درصد بازماندگی	درصد هج
P3	$90/00 \pm 2/21^a$	$89/35 \pm 2/50^a$
P6	$93/50 \pm 1/70^a$	$88/05 \pm 2/02^a$
C	$80/30 \pm 2/90^b$	$88/14 \pm 2/43^a$

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ )

C: فاقد پروبیوتیک، P3: جیره حاوی  $10^3$  CFU ml<sup>-1</sup> پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و P6: جیره حاوی  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم

### درصد هج سیست و درصد بازماندگی آرتمیا

با توجه به جدول فوق میانگین درصد هج سیست آرتمیا در طول دوره آزمایش هیچگونه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما مقدار آن در تیمار P3 نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود. میانگین درصد بازماندگی ناپلی آرتمیا در طول دوره آزمایش در تیمارهای حاوی پروبیوتیک به طور چشمگیری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری نشان داد. بالاترین درصد بازماندگی در تیمار P6 با  $93/50 \pm 1/70$  درصد و کمترین مقدار در تیمار شاهد (C) با  $80/30 \pm 2/90$  درصد مشاهده شد.

پارامترهای ایمنی شناختی عصاره بدن ناپلی آرتمیا نتایج بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر پارامترهای ایمنی شناختی عصاره بدن ناپلی آرتمیا در جدول ۳ آمده است.

لیزوزیم عصاره بدن ناپلی آرتمیا ( $\text{U/ml/min}$ ) با توجه به جدول ۲، میزان لیزوزیم موجود در عصاره بدن ناپلی آرتمیا در طول دوره آزمایش با افزودن پروبیوتیک به محیط پرورش افزایش یافت اما فاقد اختلاف معنی دار با گروه شاهد بود. بالاترین میزان لیزوزیم در تیمار P6 مشاهده شد.

جدول ۲- شاخص های بیوشیمیابی عصاره بدن آرتمیا تحت سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم

Table 2: Biochemical indices of Artemia body extract under different levels of *L. plantarum* probiont.

تیمار	گلوكز (mg/dl)	پروتئین (g/dl)	کل کورتیزول (ng/ml)	آلبومن (g/dl)	لیزوزیم (U/ml/min)
P3	۴۲۷/۳۵±۱۰/۲۲ <sup>a</sup>	۵/۰۵±۲/۱۱ <sup>a</sup>	۹/۰۵±۲/۰۰ <sup>a</sup>	۵/۰۵±۲/۱۱ <sup>a</sup>	۳۸/۴۰±۲/۶۰ <sup>a</sup>
P6	۴۰۹/۰۵±۱۶/۰۲ <sup>a</sup>	۵/۶۰±۱/۱۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰±۱/۷۰ <sup>a</sup>	۱/۴۶±۰/۱۵ <sup>a</sup>	۴۲/۱۵±۴/۶۶ <sup>a</sup>
C	۳۹۸/۱۴±۲۲/۲۲ <sup>a</sup>	۴/۲۰±۱/۶۲ <sup>b</sup>	۹/۱۰±۱/۸۲ <sup>a</sup>	۱/۱۹±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۳۵/۸۳±۳/۱۲ <sup>a</sup>

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است ( $P<0.05$ )

C: فاقد پروبیوتیک، P3: جیره حاوی  $10^3$  CFUml<sup>-1</sup> پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و P6: جیره حاوی  $10^6$  پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم

جدول ۳- پارامترهای ایمنی شناختی آرتمیا تحت سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم  
Table 3: Immunological parameters of Artemia under different levels of *L. plantarum* probiont.

تیمار	ایمنوگلوبولین M (mg/dl)	فعالیت فنول	آسپارتات آمینو	آلائین آمینو	ترنسفراز	ترنسفراز	اکسیداز	اکسیداز	ترنسفراز	ترنسفراز	آسپارتات آمینو	آلائین آمینو	فعالیت فنول	
P3	۸۸/۱۵±۶/۰۱ <sup>a</sup>	۱۴۷/۴۸±۱۹/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۰۴۴±۰/۰۱۲ <sup>b</sup>	۰/۰۴۴±۰/۰۱۲ <sup>b</sup>	۰/۰۳۶±۰/۰۱۲ <sup>b</sup>	۰/۰۳۶±۰/۰۱۰ <sup>b</sup>								
P6	۹۵/۶۰±۳/۵۰ <sup>a</sup>	۱۶۷/۷۶±۱۶/۱۶ <sup>a</sup>	۰/۰۲۳±۰/۰۱۳ <sup>b</sup>	۰/۰۲۳±۰/۰۱۳ <sup>b</sup>	۰/۰۳۴±۰/۰۱۰ <sup>b</sup>	۰/۰۳۴±۰/۰۱۰ <sup>b</sup>								
C	۷۶/۴۶±۳/۳۱ <sup>b</sup>	۱۱۲/۷۶±۱۵/۰۲ <sup>b</sup>	۰/۰۶۷±۰/۰۱۲ <sup>a</sup>	۰/۰۶۷±۰/۰۱۲ <sup>a</sup>	۰/۰۵۴±۰/۰۱۱ <sup>a</sup>	۰/۰۵۴±۰/۰۱۱ <sup>a</sup>								

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است ( $P<0.05$ )

C: فاقد پروبیوتیک، P3: جیره حاوی  $10^3$  CFUml<sup>-1</sup> پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و P6: جیره حاوی  $10^6$  پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم

### فعالیت فنول اکسیداز

میزان فعالیت فنول اکسیداز عصاره بدن آرتمیا با افزایش میزان پروبیوتیک به محیط پرورش افزایش افزایش معنی داری نشان داده است بطوریکه میزان آن در تیمار P3 بیشتر از گروه شاهد و در تیمار P6 نسبت به هر دو تیمار دیگر بالاتر بود.

### ایمنوگلوبولین M (mg/dl)

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۳، میانگین ایمنوگلوبولین M عصاره بدن ناپلی آرتمیا با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم افزایش یافت و با گروه شاهد اختلاف معنی داری نشان داد. میانگین ایمنوگلوبولین M در تیمار P6 بالاترین مقدار را به خود اختصاص داده بود و کمترین میزان آن نیز در گروه شاهد مشاهده شد.

آرتمیا تاثیر بگذارد که در این میان، بین میزان پروتئین کل عصاره بدن آرتمیا در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت. میانگین پروتئین کل، لیزوزیم، آلبومین و گلوکز در تیمارهای حاوی پروبیوتیک افزایش یافت. دلیل افزایش دو پارامتر آلبومین و پروتئین در گروه آزمایشی را می توان به تاثیر تعديل کننده اینمی پروبیوتیک بر سلول های هپاتوپانکراس مربوطه دانست که ظرفیت های آنابولیک سلول های هپاتوپانکراس در تولید پروتئین های خون را فعال می کند. عبداللهی آرپناهی و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی اثر دو گونه پروبیوتیک پاسیلوسی بر پاسخ های اینمی پست لارو میگوی پا سفید پرداختند که نتایج ایشان همسو با نتایج حاصله از این آزمایش بود. مطالعه ایشان نشان داد که اختلاف معنی داری بین برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی عصاره بدن موجود در گروه های پروبیوتیکی با گروه شاهد وجود داشت. سطوح پارامترهای بیوشیمیایی همچون گلوکز، پروتئین کل، لیزوزیم، کورتیزول و ایمنوگلوبولین M در میگوهای تغذیه شده با جیره مکمل شده با پروبیوتیک به طور معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود. نتایج به دست آمده از Kamgar و همکاران (۲۰۱۳) نیز موافق با نتایج این تحقیق است. طبق گزارش Kamgar و همکاران (۲۰۱۳) استفاده از باکتری پاسیلوس سابتیلیس در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان موجب افزایش میانگین پروتئین کل و آلبومین سرم شد. استفاده از پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس موجب افزایش آلبومین و پروتئین تام گردیده است، زیرا برخی پروتئین های سرم همچون لکتین، ترانسفرين، کامپلمان و CRP اجزای سیستم اینمی ذاتی هستند و همچنین ایمونوگلوبولین ها ساختار پروتئینی دارند. لذا تحریک سیستم اینمی توسط پروبیوتیک، موجب افزایش اجزای فوق و در نتیجه افزایش میزان پروتئین تام سرم شده است.

در این تحقیق اختلاف معنی داری بین میزان گلوکز عصاره بدن آرتمیا در تیمارهای مختلف مشاهده نشد. اگر چه میانگین آن در نمونه های حاوی پروبیوتیک بیشتر از گروه

**آلانین آمینو ترانسفراز**  
طبق جدول ۳ میزان آلانین آمینو ترانسفراز در گروه شاهد نسبت به تیمارهای حاوی پروبیوتیک بالاتر بود و با افزایش غلظت پروبیوتیک در محیط پرورش آرتمیا میزان پارامتر ذکر شده، کاهش می یابد بطوریکه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان داد.

### آسپاراتات آمینو ترانسفراز

طبق نتایج به دست آمده از این آزمایش، میانگین شاخص اینمی آسپاراتات آمینو ترانسفراز در گروه شاهد نسبت به دیگر تیمارها بیشتر و دارای اختلاف معنی داری با سایر تیمارها بود. با افزایش غلظت پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس پلاتنتاروم در محیط پرورش آرتمیا میزان پارامتر ذکر شده اندکی کاهش یافت.

### بحث

در سال های اخیر تحقیقات فراوانی در استفاده از افزودنی های غذایی که در بهبود سلامت ماهی و میگو نقش دارند، صورت گرفته است. از جمله این افزودنی های غذایی، پروبیوتیک ها می باشند. با افزایش تقاضا برای استفاده از باکتری های مفید در آبزی پروری تا به امروزه تحقیقات بسیاری در ارتباط با اثر آنها بر رشد و بقاء آبزیان انجام شده است. در این راستا و با توجه به موقوفیت های اخیر حاصل از این روش جایگزین، سازمان خوار و بار جهانی (FAO) استفاده از پروبیوتیک ها را به عنوان موارد عمده تحقیقات آینده در آبزی پروری تعیین نموده است. در مطالعه حاضر مشخص شد که پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس پلاتنتاروم باعث افزایش درصد بازماندگی ناپلی آرتمیا شد. اما بر میزان هج سیست آرتمیا تاثیر معنی داری نداشت. مختاری و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند که پروبیوتیک باکتسیل می تواند باعث بهبود رشد و میزان پروتئین کل خون ماهی گoramی سه حال (*Trichogaster trichopterus*) شود. پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش توانست بر پارامترهای بیوشیمیایی عصاره بدن

بود که موافق با نتایج به دست آمده از این آزمایش است. با توجه به اینکه باکتری‌های پروبیوتیکی باعث تحریک تولید آنتی بادی در بدن می‌شوند (Jones *et al.*, 1993) M را در پس می‌توان انتظار افزایش میزان ایمنوگلوبولین در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به تیمار شاهد داشت. تجزیه و تحلیل داده‌های حاضر نشان داد که میزان پارامترهای ایمنی آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در تیمارهای حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلتاروم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت که با نتایج دیگر محققان مطابقت داشت.

### نتیجه گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که بکارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلتاروم در سطوح مورد مطالعه می‌تواند موجب بهبود پارامترهای بیوشیمیایی همچون افزایش سطح پروتئین کل، آلبومین و لیزوزیم و نیز کاهش سطح کورتیزول عصاره بدن آرتmia شود. پروبیوتیک مذکور همچنین می‌تواند باعث بالابردن درصد بازماندگی ناپلی آرتmia و در غلاظت  $10^3$  CFU ml<sup>-1</sup> موجب افزایش درصد تخم گشایی سیست شود. علاوه بر این سطح پارامترهای ایمنی شناختی عصاره بدن آرتmia نظری ایمنوگلوبولین و فعالیت فنول اکسیداز بیشتر و شاخص‌های دیگر همچون آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز کمتر شد که حاکی از تاثیر مثبت این پروبیوتیک بر شاخص‌های مذکور می‌باشد.

### منابع

- احمدی، س..، سلطانی، م..، شمسایی مهرجان، م..، رجبی اسلامی، ۵. و پیغان، ر..، ۱۳۹۳. مقایسه تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس بر شاخص‌های رشد، بقاء و فعالیت آنزیمی میگویی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). پایان نامه، دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم و تحقیقات، تهران.

شاهد بود. همسو با این نتایج می‌توان به تحقیق Olmos و همکاران (۲۰۱۱) اشاره کرد که سطح گلوكز سرم میگوهای تغذیه شده با خوراک سویای حاوی باسیلوس سابتیلیس نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت. یافته‌های تحقیق حاضر در مورد لیزوزیم مطابق با یافته‌های احمدی و همکاران (۱۳۹۳) می‌باشد که این محققین بیان کردند که میزان لیزوزیم با افزودن پروبیوتیک به جیره میگویی وانمی افزایش می‌یابد.

تجویز خوراکی برخی از گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیکی موجب افزایش پاسخ ایمنی همچون افزایش فعالیت فاگوسیتوز، لیزوزیم و فعالیت فنول اکسیداز می‌شوند (Panigrahi *et al.*, 2007). نتایج دیگر تحقیقات نشان داده است که کاهش ناچیز در میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز موجب کاهش مقاومت میگو به عوامل بیماریزا می‌شود (Li *et al.*, 2005). همسو با نتایج دیگر محققین، در این پژوهش نیز بیشترین میزان فعالیت فنول اکسیداز و ایمنوگلوبولین M در تیمار P6 مشاهده شد که به مرتب نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. Rengpipat و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که نرخ بازماندگی و همچنین تعداد هموسیت‌ها و فعالیت فنول اکسیداز همولنف میگویی وانمی تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت و به طور چشمگیری افزایش یافت که با نتایج پیش رو هماهنگ است. احمدی و همکاران (۱۳۹۳) بیان نمودند که فعالیت آنزیم فنول اکسیداز میگویی وانمی در تیمارهای حاوی پروبیوتیک پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. میزان ایمنوگلوبولین M همولنف نیز در تیمارهای آزمایشی به مرتب بالاتر از تیمارهای فاقد پروبیوتیک بود. Teseng و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت فنول اکسیداز، درصد فعالیت فاگوسیتوزی و قدرت باکتری کشی میگویی وانمی تغذیه شده با پروبیوتیک *B. subtilis* در مواجهه با *Vibrio alginolyticus* دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد

- determination of total protein in serum. I. Development and Validation. Clinical Chemistry, 10:42-50.
- Jones, S.R.M., Stevenson, R.M.W. and Paterson, W.D., 1993.** Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 4: 93–95. Doi: 19962207476.
- Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M. and Ghane, M., 2013.** Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge infections. Advanced Studies in Biology, 5: 37-50.  
DOI:org/10.12988/asb.2013.13004.
- Lavens, P., and Soregeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture organization of The United Nations. New York, USA. pp.132-137,
- Li, J.Q., Tan, B.P. and Mai, K.S., 2005.** Dietary probiotic *Bacillus* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 291: 35-40. Doi: 20093279336.
- Liu, C.H., Chiu, C.S., Lin, P.L. and Wang, S.W., 2009.** Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus* حسینی، ع. ر، اورجی، ح، یگانه، س، و شهابی، ح، ۱۳۹۳، تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی روی رشد، فاکتورهای خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر، مجله علمی شیلات ایران، ۴۵-۳۵: (۲)۲۲.
- عبداللهی آرپناهی، د، جعفریان، ح، سلطانی، م، و قلی پور کنعانی، ح، ۱۳۹۳، بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک های پاسخ های ایمنی و فلور میکروبی روده پست لارو میگویی پاسفید غربی، مجله علمی شیلات ایران، ۱۰۵: (۴)۲۳.
- مختری، م، ایمانپور، م. ر، حاجی مرادلو، ع. م، و حسینی فر، س.ح، ۱۳۹۵، اثرات پروبیوتیک باکتسول و پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، پارامترهای خونی و مقاومت در برابر استرس شوری ماهی گورامی سه خال (Trichogaster trichopterus)، فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۸(۳): ۱۹۹-۲۰۶.
- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A. and Rajan, J.S., 2004.** Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology, 17:115-120. DOI: 10.1016/j.fsi.2003.11.007.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004.** Hematologic and serum biochemical values for jundia' (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology Biochemistry, 30: 21-25. DOI:10.1007/s10695-004-5000-1.
- Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T.J.R. and Schaffer, R.A., 1981.** Candidate reference method for

- vannamei*, by a protease producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20 from natto. Journal of Applied Microbiology, 107:1031-41. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x.
- Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, 29: 2-14. DOI:10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- Olmos, J.L., Ochoa, J. and Paniagua-Michel, R., 2011.** Contreras, Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* Probiotic strains. Marine Drugs, 9(6):1119-32. DOI: 10.3390/md9061119.
- Panigrahi, A. and Azad, I.S., 2007.** "Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario". Fish Physiology Biochemistry, 33: 429-440. DOI:10.1007/s10695-007-9160-7.
- Rahiman, K.M.M., Jesmi, Y., Thomas, A.P. and Hatha. A.A.M., 2010.** Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research, 41:120-134. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02473.x.
- Rengipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta. P., 2000.** Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-88. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00440-3.
- Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993.** Non-Specific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Disease diagnosis and prevention methods, FAO-project GCP/INT/JPA, IFI, Olsztyn, Poland. pp105-112.
- Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-musavi, H.A. and Zargar, A., 2010.** Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal Fisheries and Aquatic Science, 5:191-199. DOI: 10.3923/jfas.2010.191.199.
- Teseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C. and Liu, C.H., 2009.** Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish and Shellfish Immunology. 26: 339–344. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.12.003.
- Verschueren, L. Rombaut, G. Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64, 655–671. DOI:10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.

## **Effect of *Lactobacillus plantarum* on survival rate, biochemical and immunity parameters of *Artemia hemolymph***

Koraei, Z.<sup>1</sup>, Aberoumand, A.<sup>1\*</sup>, Ziae nejad S.<sup>1</sup>

\* aberoumandali@yahoo.com

1- Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

### **Abstract**

Because of the fact that improving hosts immunity is one of the most important applications of probiotic, the effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* on survival rate, biochemical and immunity parameters of *Artemia* were investigated in this study. For this purpose, *Artemia urmiana* cysts were desiccated and hatched according to the standard methods. This experiment was carried out in three treatments with three replications for each treatment. Different treatments contained various levels of probiotic *Lactobacillus plantarum* including 0 (C),  $10^3$  CFUml<sup>-1</sup> (P3) and  $10^6$  CFUml<sup>-1</sup> (P6). The duration of the test period was 10 days. The results showed that the percentage of hatch, survival rate, biochemical indices and the immune parameters of *Artemia* were improved. The highest survival rates were observed for the treatments containing probiotic with the level of  $90\pm3.33\%$  in P3 and  $93.50\pm1.70\%$  in P6 which were significantly different as compared to that of the control group ( $P<0.05$ ). Biochemical parameters such as the levels of total protein, albumin and lysozyme were increased, whereas the level of cortisol in *Artemia* was decreased. In addition, the highest levels of immune parameters of *Artemia* such as the immunoglobulin and phenol oxidase activity were observed in the P6 treatment with the amounts of  $95.60\pm3.50$  and  $167.76\pm16.16$  percent, respectively. Other indicators such as the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were lower in the treatments containing probiotic as compared to those of the control group indicating a positive effect of this probiotic on these parameters.

**Keywords:** Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, *Artemia*, Biochemical indices, Immune parameters

---

\* Corresponding author