View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons



[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

# بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک‌های باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی پا سفید غربی *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

داریوش عبداللهی آرپناهی[۱]*، حجت‌الله جعفریان[۱]، مهدی سلطانی[۲]، حُسنی قلی‌پور کنعانی[۱]

* dabdollahi8@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران
۲- استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳

## چکیده

در مطالعه حاضر تأثیر مصرف جیره‌های حاوی *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis* در سه قالب تجاری، تجاری- بومی و بومی بر روی برخی شاخص‌های ایمنی (گلوکز، آلبومین، پروتئین کل، لیزوزیم، کورتیزول، ایمونوگلوبولین M (IgM) و فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) ارزیابی شد. میگوها در طول دوره آزمایش (۶۰ روز) با چهار جیره متفاوت تغذیه شدند: شاهد (بدون پروبیوتیک)، جیره T1 مکمل شده با $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU $g^{-1}$ از پروبیوتیک تجاری، جیره T2 با $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU $g^{-1}$ از پروبیوتیک تجاری- بومی، جیره T3 با $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU $g^{-1}$ از پروبیوتیک بومی. در پایان دوره آزمایش، سطوح پارامترهای بیوشیمیایی (گلوکز، پروتئین کل، لیزوزیم، کورتیزول، IgM) در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک بطور معنی‌داری نسبت به میگوهای تغذیه شده با جیره شاهد بیشتر بود. با این وجود، اختلاف معنی‌داری در غلظت آلبومین بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشد، اما پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره‌های T1، T2 و T3 (به ترتیب ۱/۱۹، ۱/۱۵ و ۱/۱۴) مقدار آن افزایش یافت. همچنین تراکم جمعیت باکتری‌های باسیلوس شمارش شده در دستگاه گوارش میگوهای تغذیه شده با پروبیوتیک بطور معنی‌داری نسبت به شاهد بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک‌های باسیلی می‌تواند موجب بهبود پارامترهای ایمنی و تعدیل فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی سفید غربی گردد.

**واژگان کلیدی:** میگوی سفید غربی، پروبیوتیک، باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس لیچنی‌فورمیس، ایمنی

*نویسنده‌مسئول

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

## مقدمه

صنعت پرورش میگو خطرات جدی را تجربه کرده است که در این میان، بیماری‌های میگو ناشی از باکتری‌های فرصت‌طلبی همچون ویبریو (Liu *et al*., 2004) و ویروس‌ها (Teng *et al*., 2006) از مشکلات عمده‌ای است که می تواند منجر به ضرر و زیان بزرگ اقتصادی شود.

سازوکار دفاعی در میگو بر خلاف مهره‌داران، فاقد ایمنی انطباقی[1] است و کاملاً به ایمنی ذاتی یا طبیعی[2] خویش وابسته است. بنابراین، محصولاتی همچون محرک‌های ایمنی و پروبیوتیک‌ها که می‌توانند موجب افزایش ایمنی میزبان و مقاومت نسبت به بیماری شوند، در حال حاضر در پیشگیری از بیماری‌های میگو مورد استفاده می‌گیرد و تمایل به استفاده از آن‌ها نیز در سال‌های اخیر افزایش یافته است (Sakai, 1999; Farzanfar, 2006). پروبیوتیک‌ها باکتری‌های بی‌ضرری هستند که موجب تحریک سلامت جانور میزبان از طریق حضور مستقیم و یا حفاظت غیر مستقیم در برابر باکتری‌های مضر می‌شوند. اثرات مثبت استفاده از برخی باکتری‌های مفید در آبزی‌پروری به خوبی مستند شده است (Farzanfar, 2006; Decamp *et al*., 2008) و درمان با پروبیوتیک‌ها نیز به سرعت افزایش یافته است. پروبیوتیک‌ها در رشد حیوانات پرورشی (Decamp *et al*., 2008) سودمند بوده و به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های حیوانات پرورشی به حساب می‌آیند (Rengpipat *et al*., 2000).

باسیلوس سابتیلیس یک باکتری ساپروفیت گرم مثبت، غیر بیماری‌زا بوده که اسپور آن به طور معمول در هوا، آب، گرد و غبار، خاک و رسوبات یافت می‌شود (Gatesoupe, 1999; Green *et al*., 1999). اثرات درمانی باسیلوس سابتیلیس به عنوان عامل محرک ایمنی در انواع بیماری‌های انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاهی[3]، تحریک ترشح ایمونوگلوبولین A در شرایط میدانی[4] و به عنوان یک عامل میتوژنیک[5] در شرایط آزمایشگاهی مستند شده است (Green *et al*., 1999). چندین مقاله تحقیقاتی در مورد فواید استفاده از باسیلوس به منظور بهبود فاکتورهای ایمنی و فلور میکروبی روده در آبزی‌پروری منتشر شده است. Tseng و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس در جیره غذایی میگوی پا سفید غربی موجب بهبود فاکتورهای ایمنی در این میگو می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تلقیح با سویه‌های باکتریایی در پرورش لارو میگوی پا سفید غربی (ناپلیوس مرحله V) مانع از تجمع[6] سویه‌های بیماری‌زا می‌شود زیرا پروبیوتیک‌ها با موفقیت در دستگاه گوارش لارو تجمع یافته اند (Gomez-Gil *et al*., 2000). همچنین باسیلوس S11 اثرات مثبتی بر پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر باکتری فلورسنت ویبریو هارویی (*Vibrio harveyi*) در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) را نشان داد (Rengpipat *et al*., 2000). در مورد تأثیر باکتری‌های باسیلوس تجاری و بومی به عنوان پروبیوتیک بر روی شاخص‌های ایمنی میگوی پا سفید غربی در داخل کشور گزارشات علمی محدودی وجود دارد. لذا در مطالعه حاضر، اثرات باکتری‌های پروبیوتیک باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور میکروبی میگوی پا سفید غربی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### پروبیوتیک‌های باسیلوسی مورد استفاده

اسپور باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پروتکسین آکواتک[7] تهیه گردید. این محصول تجاری بصورت سوسپانسیون باکتریایی (مخلوط دو باکتری *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis*) بود که از سوسپانسیون محصول فوق با استفاده از دستورالعمل شرکت پروتکسین، غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ اسپور در هر میلی لیتر محیط فعال سازی به

[1] Adaptive immunity
[2] innate immunity
[3] In vitro
[4] In vivo
[5] mitogenic
[6] colonization
[7] Protexin Aquatech. UK.

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

همراه محیط کشت در مدت زمان ۸ ساعت فعال‌سازی و آماده گردید. اسپور بر روی محیط کشت ژلاتینه TSA[8] کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C انکوباسیون شدند تا کلنی‌ها ظاهر شود (Gomez- Gil *et al*., 1998) . کلنی‌های مربوطه به محیط کشت جدید TSAانتقال داده شد و به صورت خطی جهت خالص‌سازی و رقیق‌سازی کشت داده شدند.

باسیلوس‌های پروبیوتیک بومی (*B. subtilis* و *B. licheniformis*) بکار رفته در این طرح از دستگاه گوارش بچه ماهیان انگشت‌قد فیل‌ماهی (*Huso huso*) جداسازی شدند که برای آماده‌سازی این پروبیوتیک‌ها، ابتدا سوسپانسیون هر دو باکتری بر روی محیط کشت ژلاتینه TSA کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C انکوباسیون گردیدند. سپس از کلنی‌های کشت داده شده و با استفاده از محلول نیمه مک‌فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Biochrom (Libra S22 میزان غلظت‌های مورد نظر بر مبنای CFU/mL با تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (Zokaeifar *et al*., 2012). برای تهیه دوز پروبیوتیک تجاری- بومی (با نسبت برابر از هر کدام) نیز به همین طریق عمل گردید. در نهایت دوز باکتریایی مورد نظر ($۱/۵\times۱۰^{۶}$) را که برای سه تیمار آزمایشی یکسان بود از طریق اسپری کردن به سطح غذای میگو اضافه شد. به جیره تیمار شاهد هیچ نوع مکمل پروبیوتیکی اضافه نگردید.

## طرح آزمایش

این آزمایش در مرکز تکثیر و پرورش آبزیان واقع در شهرستان گمیشان انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، ۶۰۰ قطعه پست‌لارو میگوی پا سفید غربی با میانگین (±SD) وزنی ۶/۵۴±۵۰ میلی‌گرم ($PL_{15}$) از همین مرکز تهیه و پس از طی دوره آداپتاسیون و زیست‌سنجی اولیه، به مخازن رهاسازی گردیدند. آزمایش در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۵۰ لیتری پر شده با آب دریا که هر کدام به طور تصادفی ۵۰ قطعه میگو را در بر می‌گرفت انجام شد و هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. در کل دوره آزمایش، نوسانات دمایی آب ۳۲-۲۸ سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۶/۷-۶/۱ میلی‌گرم در لیتر، شوری ۴۲-۳۸ قسمت در هزار و pH آب ۸/۵-۸/۳ در نوسان بود. غذای بکار رفته ساخت شرکت هوورراش و حاوی ۳۸ درصد پروتئین، ۹ درصد چربی و سطح انرژی برابر با ۴۵۲۳ کالری بر گرم بود. میگوها با یکی از چهار جیره غذایی (شاهد، جیره T1، T2 و T3) تغذیه شدند. نرخ تغذیه بر اساس ۷٪ توده زنده در روز بود (Pazir *et al*., 2008) که با میزان برابر در ساعت‌های ۶، ۱۴ و ۲۲ به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. قبل از غذادهی هر بعد از ظهر؛ مدفوع و پوسته اسکلت خارجی پست‌لاروها از هر تانک به وسیله سیفون کردن برداشته می‌شد. همچنین میزان جیره روزانه هر ۱۰ روز یک‌بار با زیست‌سنجی نمودن میگوها محاسبه گردید.

**جدول ۱ : شرایط تیمارهای آزمایشی**

| تیمار | تغذیه و طرح آزمایش |
|---|---|
| شاهد | جیره پایه بدون دریافت پروبیوتیک |
| T1 | غذای مکمل شده به‌وسیله باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU/g feed |
| T2 | غذای مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری+ بومی با نسبت برابر از هر یک (غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU/g feed) |
| T3 | غذای مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیک بومی در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU/g feed |

## سنجش فاکتورهای عصاره بدن میگو

به منظور سنجش تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف در پست‌لاروها، در پایان دوره پرورش به علت کوچکی اندازه آن‌ها و عدم همولنف‌دهی به میزان کافی، از روش همگن کردن بدن آن‌ها استفاده شد (Postlethwaite & Mcdonald, 1995; Prodocimo *et al*., 2007). نمونه‌های هر تکرار با هم آمیخته شده[9] (Gullian *et al*., 2004) و در دستگاه هموژنایزر له

[8] Trypticase soy agar

[9] pooled

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

شدند. سپس بدن له شده پست‌لاروها به لوله‌های شیشه‌ای استریل در ۴ °C انتقال داده شد و پس از آن درون دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه قرار گرفتند (Postlethwaite & Mcdonald, 1995; Prodocimo *et al*., 2007). در مرحله بعد مایع قسمت فوقانی لوله‌ها که همان عصاره بدن می‌باشد، برای اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف به آزمایشگاه منتقل گردید.

سنجش گلوکز: اندازه‌گیری میزان گلوکز در سرم به روش فتومتریک صورت گرفت (Thomas, 1998). اساس این آزمایش به این قرار است که آب اکسیژنه آزاد شده از گلوکز در مجاورت آنزیم گلوکز اکسیداز، با فنول و ۴-آمینو آنتی‌پیرین، آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است (با مقدار گلوکز رابطه مستقیم دارد). نمونه سرم حاوی محلول ضد انعقاد در دمای ۲۵-۲۰ °C به مدت ۱ روز نگه‌داشته شد. پس از آن، نمونه‌ها به روش فتومتریک در برابر بلانک با طول موج ۵۴۶ نانومتر قرار داده شده و ثبت گردیدند.

سنجش آلبومین: برای اندازه‌گیری آن از روش بروموکرزل گرین (BCG)[10] کالریمتری بهره گرفته شد (Soltani *et al*., 2010). در این کیت از BCG جهت ایجاد کمپلکس با آلبومین و تولید رنگ قابل سنجش در طول موج ۶۴۰-۶۲۰ نانومتر استفاده شد.

سنجش پروتئین کل: برای اندازه‌گیری پروتئین کل[11] که شاخص تغییرات در سطح پروتئین می‌باشد از روش بیورت[12] استفاده شد (Doumas *et al*., 1981). در این روش پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها در شرایط قلیایی با یون‌های مس دو ظرفیتی ایجاد کمپلکس آبی ارغوانی می‌کند که در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین کل در نمونه می‌باشد.

سنجش لیزوزیم: سنجش لیزوزیم سرم خون از طریق جذب نوری و در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش کورتیزول: به منظور اندازه‌گیری میزان کورتیزول از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون استفاده شد.

سنجش ایمونوگلوبولین M (IgM)[13]: برای اندازه‌گیری IgM از روش نفلومتری[14] استفاده شد. در این روش IgM موجود در نمونه سرم با آنتی‌بادی ضد IgM در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شود. نفلومتر نور تک‌رنگ موازی در طول موج‌های بین ۸۴۰ - ۴۰۰ نانومتر به این محلول تابیده که پس از برخورد، به کمپلکس آنتی‌بادی و آنتی‌ژن متفرق شده که میزان تفرق با مقدار IgM نسبت مستقیم دارد. برای کالیبراسیون و کنترل تست های فوق از Binding site ساخت کشور انگلیس استفاده شد (Siwicki & Anderson, 1993).

**بررسی تراکم باسیلوس‌های روده**

به منظور ارزیابی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت باسیلوس‌ها در روده میگوی تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک در انتهای دوره آزمایش، به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام گرفت. برای این کار ابتدا ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری تغذیه میگوها قطع شده و در ادامه از هر تکرار ۱ عدد میگو انتخاب و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید و سپس به مدت یک دقیقه در آب استریل قرار داده شد. در ادامه به منظور از بین بردن باکتری‌های سطح بدن میگو، نمونه‌ها در محلول بنزالکونیوم کلراید ۰/۱ درصد قرار گرفت و مجدداً توسط آب استریل شسته شد. در ادامه پس از جدا نمودن روده؛ نمونه برای هموژن‌سازی به هاون چینی استریل شده منتقل شد. سپس به میزان ۹ برابر وزن روده، محلول نمکی نرمال استریل (۰/۸۵ w/v Nacl درصد) به آن اضافه شد تا هموژن گردد و از محلول فوق رقت‌های سریالی در دامنه $10^{-1}$ تا $10^{-6}$ تهیه شد که در ادامه توسط نمونه‌بردار تحت شرایط استریل، حجمی معادل ۰/۱

[10] Bromocresol Green
[11] Total protein
[12] Biuret
[13] Immunoglobulin M
[14] Nephelometry

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

میلی‌لیتر برداشته شد (Rengpipat *et al*., 1998; Mahious *et al*., 2006) و به پلیت حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار منتقل و در سطح آن پخش گردید. پس از انجام کشت باکتریایی، پلیت‌های فوق به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ در داخل انکوباتور انکوباسیون شده و در پایان، شمارش کلنی‌های تشکیل شده بر اساس لگاریتم واحد کلنی (عکس ضریب رقت × تعداد کلنی حاصله = CFU) انجام گردید (Abdollahi Arpanahi, 2013).

### تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن بر اساس شاخص‌های مورد بررسی به منظور بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها استفاده شد. از نرم افزار SPSS-16 جهت آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار Excel 2007 جهت رسم نمودارها استفاده شد. همچنین نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-wilk بررسی شد.

## نتایج

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی میگوی پا سفید غربی باعث تغییر در سطوح فاکتورهای ایمنی در این میگو می‌شود (جدول ۲). در نتیجه این آزمایش مشخص شد که استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی موجب ایجاد اختلاف معنی‌داری در سطح گلوکز، کورتیزول و پروتئین کل در مقایسه با گروه شاهد می‌شود ($P<۰/۰۵$، $df=۸$). بطوری که پایین‌ترین سطح گلوکز (۴۸۶/۶۶) و کورتیزول (۷/۶۵) به همراه بیشترین سطح پروتئین کل (۵/۷۹) در تیمار T1 (پروبیوتیک تجاری) بدست آمد. در مورد پارامتر آلبومین علی‌رغم اینکه بالاترین سطح آن در تیمار پروبیوتیک تجاری (۱/۱۹) بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$، $df=۸$).

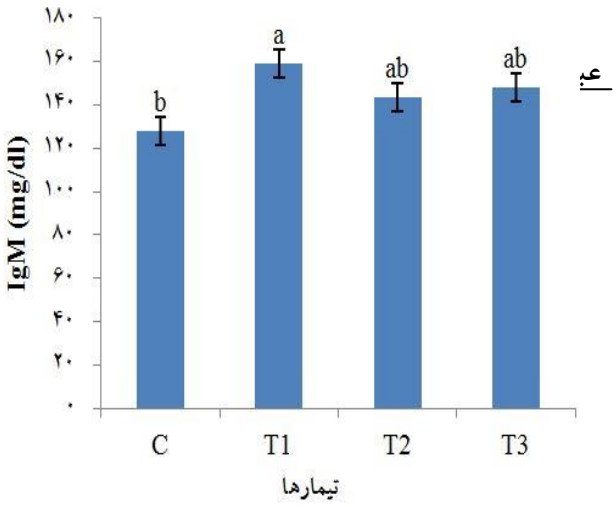
**جدول ۲: فاکتورهای ایمنی حاصل از عصاره بدن پست‌لارو میگوی پا سفید غربی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی باسیلوس‌های پروبیوتیکی**

| پارامترهای ایمنی | تیمار شاهد (Mean±SD) | تیمارهای آزمایشی(Mean±SD) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | تیمار ۱ | تیمار ۲ | تیمار ۳ |
| گلوکز (mg/dl) | ۷۴۶/۰۰±۱۷/۷۷$^{a}$ | ۴۸۶/۶۶±۲۹/۱۴$^{b}$ | ۶۵۰/۰۰±۲۳/۰۹$^{ab}$ | ۷۱۶/۶۰±۳۱/۷۹$^{a}$ |
| آلبومین (g/dl) | ۱/۱۲±۰/۰۱$^{a}$ | ۱/۱۹±۰/۰۸$^{a}$ | ۱/۱۵±۰/۰۱$^{a}$ | ۱/۱۴±۰/۰۲$^{a}$ |
| پروتئین تام (g/dl) | ۵/۱۱±۰/۰۵$^{c}$ | ۵/۷۹±۰/۰۱$^{a}$ | ۵/۶۹±۰/۰۸$^{a}$ | ۵/۴۸±۰/۰۱$^{b}$ |
| کورتیزول (ng/ml) | ۱۰/۶۷±۰/۵۱$^{a}$ | ۷/۶۵±۰/۲۵$^{b}$ | ۷/۸۵±۰/۴۳$^{b}$ | ۸/۵۰±۰/۲۳$^{b}$ |

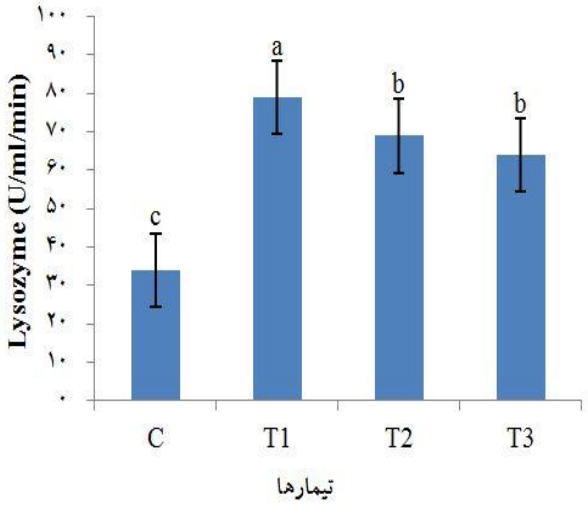
*حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌هاست ($p<۰/۰۵$).

از جمله مهم‌ترین پارامترهای ایمنی، فاکتورهای لیزوزیم و ایمونوگلوبولین می‌باشند که در این آزمایش در تیمارهای آزمایشی و بخصوص تیمار پروبیوتیک تجاری (به ترتیب: ۷۹، ۱۵۹) از سطح بالاتری نسبت به گروه شاهد (به ترتیب: ۳۴، ۱۲۸) برخوردار بودند ($P<۰/۰۵$، $df=۸$).

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

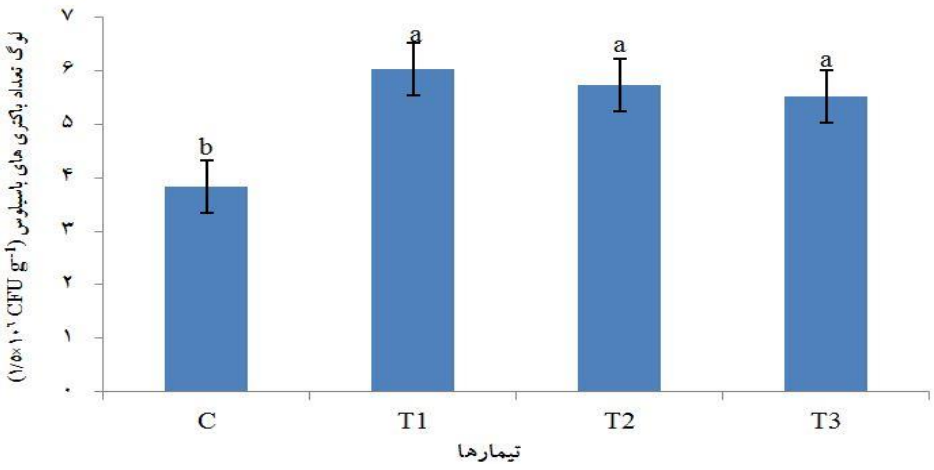



**شکل ۱: میانگین (±SD) ایمونوگلوبولین M عصاره بدن (بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمارهای مختلف**




**شکل ۲: میانگین (±SD) لیزوزیم عصاره بدن (بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمارهای مختلف**

سطوح باکتری‌های باسیلوس در انتهای دوره پرورش بر حسب لوگ تعداد کلنی در گرم وزن روده محاسبه و در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری‌های باسیلوس در بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد وجود دارد (P<۰/۰۵، df=۸). بالاترین تعداد باسیلوس بر روی محیط کشت TSA پس از ۶۰ روز پرورش در تیمار اول و به دنبال آن در تیمار دوم، تیمار سوم و گروه شاهد ثبت شد. جمعیت باسیلوس‌ها در دستگاه گوارش میگوهای تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک تجاری (تیمار T1) در مقایسه با شاهد افزایش و به ترتیب با میانگین (±SD) log CFU $g^{-1}$ ۶/۰۳±۰/۰۸ و ۳/۸۸±۰/۰۶ بدست آمد. لازم به ذکر است که از لحاظ آماری هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری‌های باسیلوس در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵، df=۸). اما اختلافات عددی آن‌ها به وضوح نمایان بود.




**شکل ۳: میانگین(±SD) لوگ تعداد باکتری‌های باسیلوس (CFU $g^{-1}$) در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی در تیمارهای مختلف و شاهد در طی ۶۰ روز پرورش با باسیلوس‌های پروبیوتیکی.**

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

## بحث

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، افزودن پروبیوتیک با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ CFU $g^{-1}$ به جیره غذایی میگوی پا سفید غربی موجب ارتقاء سطح ایمنی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد گردید که بهترین نتیجه در تیمار T1 بدست آمد. استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری بیشتر بر روی بهبود کیفیت آب (Lalloo *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2009)، عملکرد رشد (Li *et al*., 2009; Chiu *et al*., 2010; Merrifield *et al*., 2010) و فعالیت آنزیم‌های هضمی (Wang & Xu, 2007; Wang & Gu, 2010) متمرکز شده است، در مورد تأثیر باسیلوس بر روی پاسخ‌های ایمنی میگو مطالعات کمی وجود دارد.

مطالعات صورت گرفته بر روی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون در برخی از بیماری‌ها نشانگر بروز تغییرات معنی‌دار در برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون می‌باشد (Myner, 1993). پارامترهای بیوشیمیایی موجود در خون به عنوان شاخص با ارزشی برای نظارت بر سلامت و پاسخ‌های فیزیولوژیک تغذیه می‌باشد (Cnaani *et al*., 2004). از آنجا که پارامترهای خونی شرایط نامناسب را بسیار سریع‌تر از سایر پارامترها نشان می‌دهند

از آن‌ها به طور وسیعی برای توصیف وضعیت سلامت جانور و ارزیابی پاسخ‌های استرس و سازش‌های فیزیولوژیک موجود استفاده می‌شود (Blaxhall, 1972).

بر پایه این موضوع که تنظیم ایمنی میزبان یکی از مقاصد سودمند مصرف پروبیوتیک است (Medina *et al*., 2007)؛ مطالعه حاضر نشان داد که اختلاف معنا داری بین برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی عصاره بدن موجود در گروه‌های پروبیوتیکی با گروه شاهد وجود دارد که در موافقت با گزارشات اخیر است (Kamgar *et al*., 2012؛ Weifen *et al*., 2012). در همین ارتباط پارامترهای گلوکز و کورتیزول شاخص‌های مناسب فیزیولوژیک جهت بررسی رخداد استرس می‌باشند و به هنگام وقوع مقدارشان افزایش می‌یابد (Schreck *et al*., 2001; Kubilay & Vlukay, 2002) به‌طوری که با افزایش کورتیزول میزان گلوکز خون نیز افزایش می‌یابد (Khodadadi *et al*., 2009). بنابراین مناسب‌ترین شاخص‌های انواع استرس، مطالعه توأم این دو پارامتر در خون می‌باشد (Barton *et al*., 1985).

در مطالعه‌ای Kamgar و همکاران (۲۰۱۳) از باکتری باسیلوس سابتیلیس با غلظت $۱۰^{۷}$ cells $g^{-1}$ به عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا استفاده کردند. پس از ۴۵ روز آن‌ها در معرض باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیا (*Streptococcus iniae*) قرار داده شدند. نتایج نشان داد که باسیلوس سابتیلیس موجب افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین کل و آلبومین سرم در تیمار حاوی پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد شد. آن‌ها دلیل افزایش این دو پارامتر در گروه آزمایشی را به تأثیر تعدیل کننده ایمنی[15] باسیلوس سابتیلیس بر سلول‌های کبدی مربوط دانسته‌اند که ظرفیت‌های آنابولیک سلول‌های کبدی در تولید پروتئین‌های خون را فعال می‌کند. در همین راستا نیز استفاده از باکتری باسیلوس سابتیلیس سبب افزایش معنی‌دار پروتئین کل در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) نسبت به گروه شاهد شد ولی از لحاظ فاکتور ایمنی آلبومین اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد (Weifen *et al*., 2012).

در مغایرت با نتایج این تحقیق Olmos و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که سطح گلوکز سرم در میگوهایی که از خوراک سویای[16] مکمل شده با باسیلوس سابتیلیس تغذیه شده بودند نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در حالی که در آزمایش حاضر، بکارگیری پروبیوتیک‌های باسیلی موجب کاهش سطح گلوکز نسبت به تیمار شاهد شده است. همچنین در مطالعه‌ای استفاده از مکمل غذایی ال‌کارنیتین بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش در پارامترهای پروتئین تام و آلبومین سرم خون ماهی نسبت به گروه شاهد شد ولی میزان گلوکز خون تحت تأثیر این مکمل قرار نگرفت (Jalali Hajiabadi *et al*., 2009).

[15] immuno- modulatory
[16] soybeanmeal

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

با توجه به این موضوع که مقادیر آنزیم لیزوزیم به ویژه، در سرم خون منعکس کننده فعالیت منوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز کننده می‌باشند (Pirarat *et al*., 2006). بنابراین به طور مستقیم می‌توان تقویت سیستم ایمنی در پست‌لاروهای میگو را در نتیجه افزایش این آنزیم در تیمارهای مربوط به پروبیوتیک دانست.

محققان دیگری از جمله Jorgensen و همکاران (۱۹۹۳) و Engstad و همکاران (۱۹۹۲) بیان نمودند که استفاده از محرک‌های ایمنی از جمله ویتامین C در جیره غذایی ماهیان باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم می‌شود. در مجموع پارامترهای سرمی تحت تأثیر تعداد زیادی از عوامل درونی و بیرونی مانند گونه و نژاد، درجه حرارت آب، چرخه تولید مثلی، نرخ متابولیک، سن، استرس، دوره‌های نوری، وضعیت تغذیه و روش استفاده در تعیین آن‌ها قرار دارد (Abdollahi & Imanpoor, 2011).

آنچنان که از نتایج این آزمایش بر می‌آید، باکتری‌های باسیلوس موجود در این آزمایش توانسته‌اند به خوبی فلور غالب باکتری‌های لوله گوارش میگوها را تشکیل دهند. در واقع شرط لازم برای اینکه یک پروبیوتیک بتواند اثرات خود را اعمال کند نیز همین استقرار در محیط و یا دستگاه گوارش است (شکل۳). Fuller (۱۹۹۲) با بیان این مطلب که فلور دستگاه گوارش در مرحله نوزادی هنوز در حال تغییر است ذکر نموده است که این اصل کلی همواره حاکم است که تأثیر گذاری بر فلور دستگاه گوارش در طول این دوره در مقایسه با مراحل بعدی زندگی آسان‌تر است. به این دلیل که بعدها فلور نسبتاً ثابتی در لوله گوارش ایجاد می‌گردد. بنابراین می‌توان توصیه نمود که مصرف پروبیوتیک‌ها باید تا حد ممکن مدت کوتاهی پس از تخم‌گشایی و شروع تغذیه آغاز شود. Gomez-Gil و همکاران (۱۹۹۸) با اشاره به قابلیت آرتمیا جهت غنی‌سازی با دو گونه از باکتری‌های ویبریو عنوان نمودند که این امر به شدت به نوع باکتری مورد استفاده، زمان در معرض قرار دادن آرتمیا با باکتری و وضعیت باکتری (زنده یا مرده بودن آن) بستگی دارد. به هر حال گذشته از این موضوع نکته‌ای که بیش از همه در این آزمایش جلب توجه می‌نمود، تعداد بیشتر باکتری‌های پروبیوتیکی در لوله گوارش میگو در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد می‌باشد؛ که این امر به دلیل تغذیه مستقیم میگوها با جیره مکمل شده با پروبیوتیک است.

با توجه به مشکلات پرورش میگو در ایران، استفاده از جیره‌های حاوی پروبیوتیک می‌تواند موجبات تقویت سیستم ایمنی میگو را فراهم آورد. با این وجود عدم قطعیت در نتایج گزارش شده توسط محققین مختلف در زمینه بکارگیری پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری را احتمالاً می‌توان به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی و بهداشتی نگه‌داری موجود، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک موجود، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آنها، فرمولاسیون جیره غذایی، نوع پروبیوتیک انتخابی، غلظت مورد استفاده آن در جیره و نحوه اضافه کردن پروبیوتیک به جیره نسبت داد که ممکن است بر تأثیرات متفاوت پروبیوتیک روی رشد، بازماندگی و فاکتورهای ایمنی مؤثر باشد.

بررسی حاضر نشان داد که تیمار پروبیوتیک تجاری (T1) نتایج بهتری را نسبت به سایر تیمارها ارائه نموده است. اما با این حال می‌توان گفت که بکارگیری و حضور پروبیوتیک‌های بومی در تیمارهای پروبیوتیک تجاری+ بومی (T2) و بومی (T3) اثرات مثبتی را بر جای گذاشت ولی در مقایسه با پروبیوتیک تجاری میزان این اثر گذاری پایین‌تر بود. دلیل حصول چنین نتایجی را شاید بتوان به تفاوت در شرایط محیط گوارشی ماهی (محل جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بومی) و میگو، و یا استفاده از سویه‌های برتر در پروبیوتیک تجاری مربوط دانست. این نتایج تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌های افزوده شده به جیره را در کاهش استرس با توجه به نظریات مطرح شده فوق اثبات می‌کند.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مجموعه دانشگاه گنبد کاووس علی‌الخصوص آزمایشگاه آبزی‌پروری و همچنین مرکز تکثیر و پرورش آبزیان گمیشان به جهت فراهم آوردن تسهیلات لازم برای انجام پروژه صمیمانه قدردانی می‌شود.

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

## منابع

**Abdollahi Arpanahi, D., 2013.** Evaluation of *Bacillus* bacteria probiotic potential on growth performance, carcass biochemical composition, immune responses and intestinal flora of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. M.Sc. thesis, Gonbad Kavous University, Iran. 126P.

**Abdollahi, M. and Imanpoor, M.R., 2011.** Blood serum biochemical parameters of *Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870). Iranian Journal of Biology, 24, 915-924.

**Barton, B.A., Weiner, C.S. and Schreck, G.S., 1985.** Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42, 410-417.

**Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K. and Cheng, W., 2010.** Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, 29, 1053-1059.

**Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M. and Hulata, G., 2004.** Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. Aquaculture Research, 35, 1434-1440.

**Decamp, O., Moriarty, D.J.W. and Lavens, P., 2008.** Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research, 39, 334-338.

**Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T.J.R. and Schaffer, R.A., 1981.** Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and Validation. Clinical Chemistry, 10, 42-50.

**Engstad, R.E., Robertsen, B. and Frivold, E., 1992.** Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated hemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish Immunology, 2, 287-297.

**Farzanfar, A., 2006.** The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 48, 149-158.

**Fuller, R., 1992.** History and development of probiotics. In: Fuller R (Ed), Probiotis: The scientific of basis. Chapman & Hall, New York, pp.1-8.

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

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

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

Environmental Microbiology, 64, 2318-2322.

**Gómez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F., 2000.** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191, 259-270.

**Green, D., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Rica, E. and Cutting, S., 1999.** Characterization of two *Bacillus* probiotics. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4288-4291.

**Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J., 2004.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233, 1-14.

**Jalali Hajiabad, M.A., Sadeghi, A.A., Mahbubi Sofyani, N., Chamani, M., Reyazi, G.H., 2009.** Effect of L-carnitine supplementation on blood parameters and growth of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources, 47, 105-115.

**Jorgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B., 1993.** Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease, 16, 313-325.

**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.

**Khodadadi, M., Ansari, M., Peyghan, R., Mohammadi, G.H. and Raissy, M., 2009.** Evaluation of some serum parameters of Benni (*Barbus sharpeyi*) brood stocks in spawning season. Research Journal Science and Marine Technology, 4, 37-43.

**Kubilay, A. and Vlukay, G., 2002.** The effect of acute stress on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Zoology, 26, 249-254.

**Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Gorgens, J. and Gardiner, N., 2007.** Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology, 103,1471-1479.

**Li, J.Q., Tan, B.P. and Mai, K.S., 2009.** Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 291, 35-40.

**Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, J.P. and Chen, J.C., 2004.** *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms, 61, 169-174.

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

**Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. and Ollevier, F., 2006.** Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima*. Aquaculture International, 14, 219-229.

**Medina, M.I.E., Ennahar, S. and Sanz, Y., 2007.** Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strain: Relevance to probiotic selection and clinical applications. Clinical & Experimental Immunology, 150, 531-538.

**Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2010.** Probiotic applications for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquaculture Nutrition, 16, 504-510.

**Myner, K., 1993.** Changes in serum protein composition occur in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. during *Aeromonas salmonicida* infection. Journal of Fish Diseases, 16, 601- 604.

**Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. and Contreras, R., 2011.** 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, 1119-1132.

**Pazir, M.K., Matinfar, A., Aeen Jamshidi, K.H., GhorbaniVaghei, R., Zarshenas, G.A. and Garibi, Q. 2008.** The effects of probiotics *Bacillus* sp. on the growth and survival rate of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 17, 27-34.

**Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M. and Endo, M., 2006.** Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobscillus rhamnosus* against, experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 113, 339-347.

**Postlethwaite, E. and Mcdonald, D., 1995.** Mechanisms of Na+ and C-regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. The Journal of Experimental Biology, 198, 295-304.

**Prodocimo, V., Galvez, F., Freire, C.A. and Wood, C.M., 2007.** Unidirectional Na+ and Ca 2+ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. Journal of Comparative Physiology, 177, 519-528.

**Rengpipat, 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: 271-288.

**Sakai M., 1999.** Current research status of fish immunostimulants in aquaculture. Aquaculture, 172, 63-92.

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]
Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

**Schreck, C.B., Contreaas-Snchez, W. and Fitzpatrick, M.I., 2001.** Effects of stress on fish reproduction. Gamete Quality and Progeny. Aquaculture, 197, 3-24.

**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. pp.105-112.

**Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-musavi, H.A. and Zargar, A., 2010.** Effects of zataria multiflora essential oil on innat immune responses of Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal Fisheries and Aquatic Science, 5: 191-199.

**Teng, P.H., Lee, P.Y., Lee, F.C., Chien, H.W., Chen, M.S., Sung, P.F. and Su, C., Ou B.R., 2006.** Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* by ramification amplification assay. Diseases of Aquatic Organisms, 73, 103-11.

**Thomas, L., 1998.** Alanin aminotransferase (ALT), Aspartat aminotransferase (AST). Ln: Thomas L (Ed), Clinical laboratory diagnostics. TH-books verlagsgesell schaft. pp. 46-136 and 794-836.

**Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S. and Liu, C.H., 2009.** Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish & Shellfish Immunology, 26, 339-344.

**Wang, Y.B. and Gu Q., 2010.** Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. Research in Veterinary Science, 89, 163-167.

**Wang, Y.B. and Xu, Z.R., 2007.** Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127, 283-292.

**Weifen, L., Xiaoping, Z., Wenhui, S., Bin, D., Quan, L., Luoqin, F., Jiajia, Z., Yue, W. and Dongyou, Y., 2012.** Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish Physiology and Biochemistry, 38, 1585-1592.

**Zhou, X.X., Wang, Y.B. and Li, W.F., 2009.** Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287, 349-353.

**Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A. and Nejat, N., 2012.** Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene

Shellfish Immunology, 33, 683-689.

expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish &

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]

Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

[ DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103173 ]

Downloaded from isfj.ir at 9:42 +0330 on Friday December 29th 2017

# Use of *Bacillus* probiotics for immune responses and intestinal microflora of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) post larvae

Abdollahi Arpanahi D.[1*]; Jafaryan H.[1]; Soltani M.[2]; Gholipour Kanani H.[1]

* dabdollahi8@gmail.com

1- Department of Fisheries, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran
2- Department of aquatic animal health, University of Tehran, Tehran, Iran

**Key Words:** *Litopenaeus vannamei*, Probiotc, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Immunity

**Abstract**

The effect of dietary containing of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in three groups including commercial, commercial-indigenous and indigenous was investigated on the immune parameters (glucose, albumin, total protein, lysozyme, cortisol, immunoglobulin M (IgM)) and the intestinal flora of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae. The shrimp were fed for 60 days with four different diets: control (without probiotics), diet T1 supplemented with $1.5\times10^6$ CFU $g^{-1}$ commercial probiotic, diet T2 with $1.5\times10^6$ CFU $g^{-1}$ commercial-indigenous probiotic, diet T3 with $1.5\times10^6$ CFU $g^{-1}$ indigenous probiotic. At the end of experimental period, the levels of biochemical parameters (glucose, total protein, lysozyme, cortisol, IgM) of shrimp fed probiotic diets were significantly higher than in those shrimps fed the control diet for 60 days. However, albumin concentrations showed no significant difference between the experimental treatments and the control, but increased by 1.19, 1.15 and 1.14 after 60 days of feeding with diets T1, T2 and T3, respectively. Likewise, population density of *Bacillus* bacteria counted in digestive tract of shrimps treated with probiotic were significantly higher than the control group. Results of this study indicated that the addition of probiotic bacili can improve immune parameters and modulates intestinal microbiota of shrimp (*L. vannamei*) post larvae.

*Corresponding author