Arch
Original Article | مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۸، دوره ۷۴ شماره ۱، ۹۲-۸۳ | مقاله تحقیقی
DOI: 10.22059/jvr.2017.221169.2543

مقایسه اثر باسیلوس‌های تجاری و بومی (*Bacillus subtilis*-*Bacillus licheniformis*) بر برخی شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های سرمی بدن لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

داریوش عبداللهی آرپناهی[۱]، حجت الله جعفریان[۱]، مهدی سلطانی[۲]، مهسا نادری سامانی[۲]، احمد حسن پور فتاحی[۱]

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

(دریافت مقاله: ۱۲ تیر ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۵ مهر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در ارتقای پاسخ‌های ایمونولوژیکی میگوها داشته ولی اطلاعات کمی در رابطه با تأثیر مقایسه‌ای پروبیوتیک‌های تجاری و بومی بویژه در مراحل لاروی و پست لاروی میگو وجود دارد.

هدف: این مطالعه ۶۰ روزه با هدف تعیین تأثیر باکتری‌های پروبیوتیکی تجاری و بومی (*Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis*) بر برخی از شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های سرمی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) صورت پذیرفت.

روش کار: سه جیره آزمایشی با غلظت یکسان $1/5\times10^{6}$ CFU/g با باکتری‌های تجاری و بومی مکمل سازی شدند. شاهد (بدون مکمل سازی با پروبیوتیک)، ۱D (پروبیوتیک تجاری)، ۲D (پروبیوتیک تجاری+ بومی)، ۳D (پروبیوتیک بومی) برای آزمایش در نظر گرفته شدند. در پایان دوره آزمایش، همولنف میگوها با استفاده از سرنگ از حفره شکمی گرفته شد و جهت بررسی شاخص‌های همولنف به میکروتیوب‌های حاوی محلول ضد انعقاد انتقال داده شد و جهت بررسی سطح آنزیم‌های سرمی، بدن آن‌ها هموژن و عصاره آن مورد آنالیز بیوشیمیایی قرار گرفت.

نتایج: تعداد هموسیت کل، سلول‌های دانه‌دار بزرگ، سلول‌های نیمه دانه‌دار و هیالین در تیمارهایی که از پروبیوتیک تجاری تغذیه کردند در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده گردید ($P>0/05$). میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) بطور معنی‌داری در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P>0/05$). با این وجود، میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) پست‌لاروها تحت تأثیر پروبیوتیک‌های مکمل سازی شده قرار نگرفت و معنی‌دار نبود ($P>0/05$).

نتیجه گیری نهایی: باسیلوس‌های پروبیوتیکی قابلیت تأثیر گذاری بالایی بر شاخص‌های ایمنی همولنف و کاهش میزان آنزیم‌های ALT و AST در پست‌لاروهای میگوی وانامی دارند و این پروبیوتیک می‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی میگوی وانامی باشد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، شاخص‌های ایمنی، آنزیم‌های سرمی، میگوی وانامی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۹۵، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: dabdollahi8@gmail.com

How to Cite This Article

Abdollahi Arpanahi, D., Jafaryan, H., Soltani, M., Naderi Samani, M., Hasanpour Fatahi, A. (2019). Comparision of Commercial and Indigenous Bacillus (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) Effects on Some Immune Responses and Serum Enzymes Activity in Whiteleg Shrimp Post-Larvae (*Litopenaeus vannamei*). J Vet Res, 74(1), 83-92. doi: 10.22059/jvr.2017.221169.2543

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بطور گسترده در بخش‌های مختلفی از دنیا پرورش داده می‌شود. رشد سریع، بازماندگی خوب در تراکم‌های بالای پرورش و دامنه تحمل نسبت به بیماری سبب شده است تا این میگو بعنوان یک انتخاب مناسب در سیستم‌های پرورشی متراکم و نیمه متراکم در نظر گرفته شود (۳۳،۵۰). این گونه در حال حاضر به عنوان اولین گونه پرورشی میگو در ایران پرورش داده می‌شود. بنابراین، جیره‌های مصنوعی که بتواند احتیاجات ایمونولوژیکی و تغذیه‌ای را تأمین نماید موجب گسترش و بهبود تولید صنعتی می‌شود. به عنوان مثال باکتری باسیلوس می‌تواند آنزیم‌های خارجی زیادی را ترشح و سبب افزایش دامنه تحمل نسبت به دما و کم آبی شود، این باکتری‌ها بطور گسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک‌های مورد قبول و شناخته شده در غذا به کار گرفته می‌شوند (۲۷و۲۸). مطالعات نشان می‌دهد هنگامی که این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک در میگو استفاده می‌شود رشد، بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های هضمی و قابلیت هضم ظاهری غذا بهبود یافته و موجب افزایش ایمنی می‌شوند (۲۵،۳۷).

سیستم ایمنی در سخت‌پوستان شامل واکنش‌های سلولی و هومورال بوده که بطور عمده‌ای وابسته به خون یا همولنف آن‌ها می‌باشد. واکنش‌های سلولی شامل ذره‌خواری، تشکیل کپسول و برآمدگی کوچک از میکروارگانیزم‌ها و انگل‌ها؛ و تخریب آن‌ها به وسیله مولکول‌های میکروبیوسیدال و سیتوتوکسیک می‌باشد. از سوی دیگر، واکنش‌های هومورال شامل چندین ملکول محلول همچون لکتین‌های پلاسما، ترکیبات سیستم پروفنولکسیداز (proPO)، پپتیدهای ضد میکروبی و پروتئین‌های درگیر شده در انعقاد همولنف می‌باشد که در ترکیب با واکنش‌های سلولی؛ جانور را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌نماید (۳۲).

محققان شیلاتی برای طبقه‌بندی هموسیت‌ها، معیارهای مختلفی اتخاذ کرده‌اند اما با این وجود طبقه‌بندی هموسیت‌های سخت-پوستان هنوز بحث برانگیز باقی مانده است. در سخت‌پوستان هموسیت‌های سیال به طور کلی به ۳ دسته شامل سلول‌های دانه‌دار بزرگ (LGC)، سلول‌های نیمه دانه‌دار (SGC) و هیالین (HC) طبقه‌بندی می‌شوند (۱۵). هموسیت‌های سیال نه فقط از طریق ذره‌خواری و کشتن عوامل عفونی بلکه با ساخت و اگزوسیتوز ترکیبات ضد میکروبی، نقش مهمی در سیستم ایمنی میگو ایفا می‌کنند (۳۹). مطالعات صورت گرفته بر روی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون در برخی از بیماری‌ها نشانگر بروز تغییرات معنی‌دار در برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون می‌باشد (۳۰). پارامترهای بیوشیمیایی موجود در خون به عنوان شاخص با ارزشی برای نظارت بر سلامت و پاسخ‌های فیزیولوژیک تغذیه می‌باشد (۸). 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 (۴).

بیشتر تحقیقات پروبیوتیکی صورت گرفته اخیر بر روی میگوی پا سفید غربی بر روی مراحل جوانی و بلوغ متمرکز بوده است (۲۴،۴۹) و دانش کمی در مورد اثرات پروبیوتیک‌ها بر روی مراحل لاروی و پست لاروی وجود دارد. بنابراین، هدف از انجام این آزمایش؛ بررسی پاسخ‌های ایمونولوژیکی و سنجش آنزیمی در میگوی پا سفید غربی در نتیجه استفاده از جیره‌های حاوی پروبیوتیک‌های باسیلوسی جداسازی شده و تجاری (*Bacillus subtilis*; *B. licheniformis*) بود.

مواد و روش کار

سویه پروبیوتیکی و جیره: پروبیوتیک تجاری بکار رفته در این آزمایش که شامل *B. licheniformis* و *Bacillus subtilis* بود از شرکت پروتکسین آکواتک تهیه گردید. همچنین باسیلوس‌های پروبیوتیک بومی (*Bacillus subtilis*; *B. licheniformis*) مورد استفاده در این تحقیق نیز از دستگاه گوارش بچه ماهیان انگشت‌قد فیل ماهی استخراج گردید (۲۶). در ادامه جهت آماده سازی این پروبیوتیک‌ها بر اساس دستور العمل Abdollahi Arpanahi و همکاران در ۲۰۱۴ عمل گردید (۱). بدین صورت که اسپورهای باسیلوسی را بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) کشت داده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C انکوباسیون شدند تا پرگنه‌ها نمایان شود. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom, Libra S۲۲) غلظت مورد نظر در طول موج ۶۰۰ nm بر مبنای CFU/mL تعیین گردید. برای تهیه غلظت پروبیوتیک تجاری-بومی (با نسبت برابر از هر یک) نیز به همین طریق عمل گردید. در پایان غلظت $1/5\times10^{6}$ CFU/g را که برای هر سه تیمار آزمایشی یکسان بود از طریق اسپری نمودن به سطح غذای میگو اضافه گردید. میگوها در گروه شاهد در طول کل دوره آزمایش با جیره پایه تغذیه گردیدند. میگوها در تیمار ۱D، ۲D و ۳D به ترتیب با جیره‌های حاوی پروبیوتیک تجاری، پروبیوتیک تجاری- بومی و پروبیوتیک بومی با غلظت بیان شده تغذیه شدند.

طرح آزمایش: میگوهای پا سفید غربی (*L. vannamei*) از مرکز تکثیر و پرورش آبزیان گمیشان (استان گلستان) تهیه و در همان مرکز نیز آزمایش انجام پذیرفت. میگوها در مخازن فایبرگلاس با حجم آبگیری ۵۰ L لیتر نگه‌داری و برای یک هفته از جیره پایه با غذادهی ۳ بار در روز تغذیه گردیدند. میگوهای با وزن یکسان (۶/۴۵ mg±۵۰) بصورت تصادفی در ۱۲ مخزن با تراکم نگه‌داری ۵۰ قطعه در هر مخزن و ۳ تکرار برای هر تیمار ذخیره سازی شدند. مخازن با آب شور دریا که از فیلترهای ریز عبور داده شده بود و با حجم تعویض آب روزانه ۲۰ درصد، آبگیری شدند. در طول دوره پرورش درجه حرارت آب ۳۲-۲۸ °C، شوری آب ۴۲-۳۸ ppt، اکسیژن محلول ۶ mg/l و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت

www.SID.ir

روشنایی بود. میگوها روزانه ۳ مرتبه با غذای تجاری شرکت هوورراش و با نرخ غذادهی روزانه ۷ درصد وزن کل بدن تغذیه نمودند و بر اساس میزان غذای خورده شده واقعی میگو تنظیم گردید. روزانه باقی مانده جیره هر مخزن قبل از غذادهی بعدی از طریق سیفون کردن جمع‌آوری می‌گردید. به علاوه نرخ مرگ و میر در هر مخزن روزانه ثبت و در پایان ۶۰ روز آزمایش، درصد بازماندگی میگوها محاسبه شد.

روش‌های تحلیلی و شاخص‌های ایمنی: در پایان دوره آزمایش، میگوها به مدت ۲۴ ساعت قبل از دستکاری گرسنه مانده و تغذیه آن‌ها قطع گردید (۸). نرخ افزایش رشد ویژه، ADG (بر حسب g/day) و همچنین نرخ افزایش وزن نسبی، RWG (بر حسب درصد) محاسبه گردید.

۱- نرخ رشد ویژه= [لگاریتم طبیعی وزن نهایی میگو- لگاریتم طبیعی وزن اولیه میگو/ دوره پرورش×]۱۰۰

۲- نرخ وزن نسبی بدست آمده= [(گرم وزن نهایی میگو- گرم وزن نهایی میگو)/ گرم وزن اولیه میگو×]۱۰۰

هموفلنگیری: هموفلنگ با استفاده از سرنگ استریل از حفره پریکاردیال میگو گرفته شد که برای این عمل هموفلنگ ۶ میگو را گرفته و با هم آمیخته شدند (۲۴) و در میکروتیوب‌های کوچک که حاوی ۰/۴ از محلول ضد انعقاد آلزور (۱۱۵ mmol گلوکز، ۳۳۶ mmol سدیم کلراید، ۲۷ mmol سیترات سدیم و ۹ mmol EDTA با pH برابر با ۷) بود تزریق گردید.

شمارش هموسیت‌های هموفلنگ: از نمونه هموفلنگ تهیه شده برای تعیین تعداد هموسیت کل (THC) و شمارش افتراقی هموسیت‌ها (DHC) استفاده شد. تعداد هموسیت کل هموفلنگ به وسیله لام هموسیتومتر (نئوبار) و با بزرگ نمایی ۴۰ در زیر میکروسکوپ شمارش شد. همچنین برای تعیین تابلوی هموسیتی یا شمارش افتراقی هموسیت‌ها، پس از تهیه گسترش از هموفلنگ و خشک شدن کامل گسترش‌ها به وسیله جریان هوا، برای مدت زمان ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس اقدام به رنگ‌آمیزی به روش می- گرانوالد-گیمسا شد و با میکروسکوپ نوری، تعداد ۲۰۰ سلول هموسیت شمارش و تعداد هموسیت‌های دانه‌دار بزرگ، نیمه‌دانه‌دار و هیالین تعیین گردید (۱۵).

میزان هموسیت کل و شمارش افتراقی هموسیت‌ها با استفاده از معادلات زیر محاسبه گردید:

تعداد هموسیت کل (THC)= سلول‌های شمارش شده×ضریب رقیق سازی×۱۰۰۰/ حجم اتاقک لام نئوبار ($۰/۱mm^۳$)

شمارش افتراقی هموسیت‌ها (DHC)= (تعداد انواع سلول‌های هموسیتی مختلف/ هموسیت کل شمارش شده) × ۱۰۰

آنزیم‌های سرمی میگو: به منظور تعیین تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی هموفلنگ در پست‌لاروها، به علت کوچکی اندازه آن‌ها و عدم هموفلنگ دهی به میزان کافی، از روش همگن کردن بدن آن‌ها استفاده شد (۳۴،۳۵). نمونه‌های هر تکرار با هم آمیخته شده (۱۴) و در دستگاه هموژنایزر له 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 (۳۴،۳۵). در مرحله بعد مایع قسمت فوقانی لوله‌ها که همان عصاره بدن می‌باشد، برای آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی، به آزمایشگاه منتقل گردید.

سنجش ALT و AST: آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) که قبلاً به نام گلوتامیک پیرووویک ترانس آمیناز (GPT) نامیده می‌شد، و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) که قبلاً به نام گلوتامیک اگزال استیک ترانس آمیناز (GOT) نامیده می‌شد، مهم‌ترین آنزیم‌های گروه آمینو ترانسفرازها یا ترانس آمینازها هستند که با انتقال واحدهای آمین، a-Keto acid را به آمینو اسیدها کاتالیز می‌کنند. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های ALT و AST از روش IFCC و در طول موج ۳۴۰ nm استفاده شد.

سنجش آلکالین فسفاتاز (ALP): آلکالین فسفاتاز آنزیم هیدرولیتیکی است که اپتیمم فعالیت آن در پی- اچ قلیایی است. برای اندازه‌گیری آن از روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) و در طول موج ۴۰۵ nm استفاده گردید .

تجزیه و تحلیل آماری: تفاوت بین میانگین‌ها برای بررسی از نظر معنی‌داری آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تحلیل و بر اساس آزمون چند دامنه دانکن دنبال گردید. همچنین سطح معنی‌داری بکار رفته در مطالعه حاضر $P<۰/۰۵$ بود.

نتایج

در این آزمایش، تأثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر برخی پارامترهای رشد میگوی پا سفید غربی نشان داده شده است (جدول ۱). نتایج آزمایش حاکی از اختلاف معنی‌داری در وزن، طول، نرخ وزن نسبی بدست آمده و نرخ رشد ویژه شدند ($P<۰/۰۵$). بیشترین وزن (۱۲ / ۱۱۰۱ mg)، طول (۵۶/۴۶ mm)، نرخ رشد ویژه (۴/۷۸) و نرخ وزن نسبی (۸/۲۲۵۲) میگوی پا سفید غربی در تیمار تغذیه شده با غذای مکمل شده با پروبیوتیک تجاری بدست آمد.

شاخص‌های هموفلنگ: اثر پروبیوتیک‌ها بر پارامترهای هموفلنگ میگو در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها بیانگر این بود که بکارگیری باسیلوس‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در این آزمایش تأثیر معنی‌داری بر تعداد هموسیت کل هموفلنگ در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد داشت ($P<۰/۰۵$). به طوری که کمترین تعداد هموسیت کل برای تیمار شاهد ($۱۰/۷ Cell/mL\times۱۰^۶$) بدست آمد، در حالی که بیشترین تعداد آن در تیمار آزمایشی اول ($۱۳/۴ Cell/mL\times۱۰^۶$) که پست‌لاروهای میگوی سفید غربی در آن با جیره حاوی باسیلوس‌های پروبیوتیکی تجاری تغذیه شده بودند مشاهده گردید.

تعداد سلول‌های دانه‌دار بزرگ پست‌لاروهای میگو در تیمارهای

Archive of SID

جدول ۱. برخی پارامترهای رشد لارو میگوی پا سفید غربی تغذیه گردیده با غذای مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی. حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشانه معنی‌دار بودن می‌باشد($P<0/05$).

پارامتر / تیمار	شاهد	۱D	۲D	۳D
وزن نهایی (mg)	۸۱۷/۶۲±۶۶/۶۹ d	۱۱۰۱/۱۲±۴۸/۱۳ a	۹۸۳/۷۱±۶۹/۹۴ b	۸۸۸/۰۶±۵۷/۷۲ c
طول نهایی (mm)	۵۰/۲۸±۵/۵۷ d	۵۶/۴۶±۶/۳۶ a	۵۴/۱۵±۵/۰۲ b	۵۲/۳۰±۵/۴۹ c
نرخ وزن نسبی بدست آمده (درصد)	۱۶۳۴/۳±۱۵۶/۲ d	۲۲۵۲/۸±۱۴۳/۹ a	۲۰۰۱/۹±۱۷۶/۸ b	۱۷۹۷/۶±۱۵۰/۷ c
نرخ رشد ویژه (درصد وزن بدن در روز)	۴/۳۶±۰/۳۲ c	۴/۷۸±۰/۴۸ a	۴/۶۳±۰/۳۹ b	۴/۴۷±۰/۴۴ c

جدول ۲. شاخص‌های همولنف پست‌لارو میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره مکمل سازی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی (Cell/ml ×۱۰^{۶}). × حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P<0/05$). داده‌های جدول شامل میانگین داده‌ها ± میانگین خطای استاندارد می‌باشد.

شاخص‌های همولنف	شاهد	۱D	۲D	۳D
هموسیت کل	۱۰/۷±۰/۲۰ b	۱۳/۴±۰/۱۳ a	۱۲/۶±۰/۲۳ ab	۱۲/۰۰±۰/۱۰ ab
سلول‌های دانه دار بزرگ	۱/۲±۰/۰۵ b	۲/۴۰±۰/۱۱ a	۲/۰۵±۰/۰۴ ab	۱/۶۰±۰/۰۲ ab
سلول‌های نیمه دانه دار	۲/۹±۰/۰۲ b	۳/۴۵±۰/۰۵ a	۳/۲۵±۰/۰۸ ab	۳/۲۰±۰/۰۱ ab
هیالین	۶/۶۰±۰/۱۵ b	۷/۶۰±۰/۱۷ a	۷/۳۰±۰/۱۳ a	۷/۲۰±۰/۱۱ a

جدول ۳. آنزیم‌های سرم بدن پست‌لارو میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره غذایی مکمل سازی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی. × حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P<0/05$). داده‌های جدول شامل میانگین داده‌ها ± میانگین خطای استاندارد می‌باشد.

آنزیم‌های سرم بدن	شاهد	۱D	۲D	۳D
آلانین آمینوترانسفراز (IUL) (ALT-۱)	۱۶۵/۰۰±۴/۰۴ a	۱۲۵/۰۰±۸/۶۶ b	۱۳۶/۰۰±۹/۲۳ b	۱۴۷/۵۰±۳/۱۷ ab
آسپارتات آمینوترانسفراز (IUL) (AST-۱)	۱۵۶۰/۰۰±۸۰/۸۲ a	۱۰۴۵/۰۰±۶۰/۶۲ c	۱۱۸۵/۰۰±۶۳/۵۰ bc	۱۳۴۰/۰۰±۸۶/۶۰
آلکالین فسفاتاز (IUL) (ALP-۱)	۱۵۶۰/۰۰±۸۰/۸۲ a	۴۴۵۰/۰۰±۴۴/۵۳ a	۶۱۸۰/۰۰±۶۷/۹۶ a	۷۸۳۵/۰۰±۹۴/۳۵ a

آزمایشی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$). بطوری که بیشترین تعداد از این نوع هموسیت در تیمار آزمایشی اول و معادل ۲/۴۰ Cell/mL×۱۰^{۶} (۱۷/۸۵ درصد از هموسیت کل تیمار اول) بدست آمد در حالی که کمترین میزان این پارامتر در گروه شاهد و معادل ۱/۲۰ Cell/mL×۱۰^{۶} (۱۱/۲۱ درصد از هموسیت کل گروه شاهد) مشاهده گردید.

تعداد سلول‌های نیمه دانه‌دار پست‌لاروها در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$). به طوری که کمترین تعداد آن در گروه شاهد و معادل ۲/۹ (۲۷/۱۱ درصد از هموسیت کل گروه شاهد) و بیشترین تعداد آن در تیمار آزمایشی اول و معادل ۳/۴۵ (۲۵/۶۵ درصد از هموسیت کل تیمار اول) مشاهده گردید.

استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در تعداد هیالین تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد را نشان داد ($P<0/05$). کمترین تعداد سلول هیالین در گروه شاهد و معادل ۶/۶۰ (۶۱/۶۸ درصد) و بیشترین آن درتیمار آزمایشی اول ۷/۶۰ (۵۶/۵۰ درصد) مشاهده گردید.

آنزیم‌های سرم: نتایج بدست آمده از تأثیر پروبیوتیک‌ها بر آنزیم‌های سرم بدن در جدول ۳ آمده است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ALT سرم بدن پست‌لاروهای میگوی پا سفید غربی نشان داد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی، به طور معنی‌داری میزان ALT را کاهش داده‌اند و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد بدست آمد ($P<0/05$). کمترین میزان ALT معادلIUL–۱ ۱۲۵ برای تیمار اول بود که در این تیمار پست‌لاروها با جیره غذایی حاوی باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری تغذیه شده بودند، در حالی که بیشترین میزان آن در تیمار شاهد معادل IUL–۱۱۶۳ به دست آمد.

آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز سرم بدنی پست‌لاروهای میگو در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد ($P<0/05$). کمترین میزان AST سرم در تیمار آزمایشی اول (IUL–۱۱۰۴۵) و بیشترین میزان آن در گروه شاهد (IUL–۱۱۵۶۰) مشاهده شد.

استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در این مطالعه، تأثیر معنی‌داری بر ALP سرم بدن پست‌لاروهای میگو در تیمارهای مختلف نداشت ($P>0/05$). ولی از نظر عددی کاهش نسبی بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده شد و کمترین میزان این پارامتر در تیمار اول معادل IUL–۱۴۴۵۰ و بیشترین میزان این پارامتر در گروه شاهد و معادل IUL–۱۸۱۹۵ بدست آمد.

بحث

زندگی میگوها هم‌مانند سایر آبزیان ارتباط نزدیکی با میکروارگانیسم‌ها

www.SID.ir

دارد، اســتفاده از پروبیوتیک‌ها منجر به متعادل سازی فلور میکروبی روده شده و به ســبب آن عملکرد دستگاه گوارش را ارتقا می‌دهد. بدین موجب میگوهای پرورشی از عملکرد رشد بالاتری برخوردار خواهند شد (۵۳،۵۲،۵).

در آزمایش حاضر افزایش رشد در میگوهای تغذیه شده با مکمل‌های باســیلوس‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شــاهد گزارش شد. در کل پروبیوتیک‌ها با افزایش ســطوح آنزیم‌های گوارشی به هضم پروتئین‌ها، نشاسته، چربی و سلولز بهبود بخشیده و منجر به افزایش جذب مواد غذایی شده و در نهایت افزایش پارامترهای رشد را در میگو به همراه دارد (۴۷،۵۲)، با وجود اینکه این آنزیم‌های خارجی نسبت به آنزیم‌های مترشحه از دستگاه گوارش کمتر هستند ولی عامل محرک ترشح آنزیم‌های داخلی محسوب می‌شــوند (۴۷،۵۳) علاوه بر این تولید مکمل‌هایی مانند بیوتین، ویتأمین B۱۲، اسیدهای چرب، آمینو اســیدهای ضروری و بسیاری از فاکتورهای رشــد ضروری توسط باسیلوس‌ها به پیشرفت و ارتقای رشد کمک می‌کند (۱۰،۴۵).

مکانیســم عمل پروبیوتیک‌هــا در اصل به تعاملات بیــن گونه‌های پروبیوتیکی و فلور میکروبی میزبان یا سلول‌های ایمنی مخاط روده بستگی دارد، پارامترهای زیادی در اتصال پروبیوتیک‌ها به موکوس روده نقش دارند که از آن جمله می‌توان به شرایط محیطی و مقاومت ژنتیکی اشاره کرد (۹).

Wang و همــکاران در ســال۲۰۱۲ در تحقیقــی اثــر باســیل‌های پروبیوتیکــی را بــر روی پارامترهــای رشــد میگــوی پــا ســفید غربــی (*Litopenaeus vannamei*) بررســی کردند و بیان داشتند که استفاده از این باکتری‌ها بعنوان مکمل‌های غذایی افزایش رشــد و بازماندگی را در پی داشتند (۴۸).

Ziaei-Nejad و همکاران در ســال ۲۰۰۶ از آرتمیا فرانسیسکانای غنی سازی شده با باسیلوس‌های پروبیوتیکی تجاری به منظور رشد و بقاء در پرورش میگوی سفید هندی استفاده کردند (۵۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر Rengpipat و همکاران در ســال ۱۹۹۸ با استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی (Bacillus S۱۱) منجر به افزایش رشد میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) شدند (۳۶).

در میگو مهم‌ترین نقش گردش هموسیت‌ها، حفاظت از جانور در برابر میکروارگانیزم‌های مضر از طریق شرکت در بازشناسی، فعالیت ذره‌خواری و تجمع اســت (۱۸،۴۲). علی‌رغم وجود تنوع در پاسخ‌های میگو، بسیاری از آن‌ها از هموســیت میگو سرچشــمه می‌گیرند. هموسیت‌های میگو در مکانیســم‌های دفاعی مانند ذره‌خواری، کپســول گذاری، تشــکیل لخته و بازشناســی دخالت دارند (۲۰). ســطح هموسیت کل در پاسخ به عفونت، تغییرات محیطی و پوســت اندازی در بیشــتر سخت‌پوستان متفاوت است (۲۲). هموســیت‌های ســیال نه فقط از طریق ذره‌خواری و کشــتن عوامل عفونی بلکه با ســنتز و اگزوسیتوز ترکیبات ضد میکروبی، نقش مهمی در سیستم ایمنی میگو ایفا می‌کنند (۳۹).

یکی دیگــر از ویژگی‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها کمک به افزایش شرایط سلامت و کنترل زیســتی بیماری‌ها از طریق بهبود فعالیت ایمنی میگواســت (۴۱). تعــداد کل هموســیت‌ها بعنــوان یکی از شــاخص‌های ســلامت میگو، جذب مواد غذایی به صورت کارآمد و بازماندگی مناســب محسوب می‌شود (۳۱). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، باسیلوس‌های پروبیوتیکی موجب افزایش معنی‌داری در تعداد کل هموسیت‌ها نسبت به گروه شاهد شدند که می‌تواند به دلیل عملکردهای مختلف پروبیوتیک در بدن از جمله تأثیر مثبت بر ســلول‌های هملونف و سلامتی میگو باشد. در موافقت بــا نتایج این مطالعــه Kongnum و Hongpattarakere در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) در جیره غذایی میگوی پا ســفید غربی باعث افزایش تعداد کل هموسیت پس از رویارویی با ویبریوهارویی نسبت به گروه شاهد شده است (۲۱). نتایج مشابهی نیز توسط Vieira و همکاران در ســال ۲۰۰۷ گزاراش شــده اســت، آن‌هــا بیان کردند کــه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا ســازی شده از میگوی مولد سفید غربی که به عنوان یک محرک ایمنی استفاده شده بود پس از تزریق ویبریوهارویی موجــب افزایش تعداد کل هموســیت و همچنین افزایش باکتری اســید لاکتیک در دستگاه گوارش این میگو شد (۴۶). افزایش در گرانولوسیت‌ها (LGC, SGC) و هیالین نتیجه فعالیت محرک ایمنی است (۴۰) و توانایی تحریک ایمنی باسیلوس‌ها به واسطه ترکیبات اصلی دیواره سلولی آن است که منجر به افزایش ایمنی میگو می‌شــود (۴۱). همســوی با نتایج تحقیق حاضر Jussila و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مطالعه‌ای تعداد هموسیت کل و تعداد هموسیت افتراقی را در لابسترهای صخره‌ای غربی (*Panulirus cygnus* George) تحت اســترس پس از جمع آوری بررســی کردند و بیان نمودند که نســبت SGC در لابســترها افزایش نشان داده است (۲۱). در مخالفت با این نتایج، Gullian و همکاران در ســال ۲۰۰۴ ضمن بیان این مطلب که تغییر در تعداد افتراقی هموســیت نشان دهنده یک هشدار ایمنی است، گزارش نمودند که تحریک میگوی سفید غربی با باسیلوس و ویبریو آلجینولیتیکوس تفاوت قابل توجهی را در تعداد هموسیت کل نشان نداد اما به طور معنی‌داری باعث افزایش در جمعیت سلول‌های هیالین شد. همچنیــن اگر چه هیچ گونه تفاوت معنی‌داری از لحاظ تعداد ســلول‌های دانه‌دار بزرگ و نیمه دانه‌دار مشاهد نشد و جمعیت آن‌ها ثابت باقی ماند اما این سلول‌ها به شدت تحریک شدند (۱۴). کاهش در نسبت SGC می‌تواند با توجه به نوســانات LGC، SGC، HC نسبت به زمان باشد (۱۰). نسبت LGC پایین‌تر و SGC بالاتر در لابســتر صخــره‌ای غربی در معرض هوا (air-exposed) کمتر از آن‌هایی بود که در معرض هوا نبودند (۱۱).

Van de Braak و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره کردند که افزایش در هموسیت‌های جوان و نابالغ ممکن است شاخصی از فعالیت تکثیر شدید از بافت خونساز باشد. همچنین کاهش در سلول‌های نیمه دانه‌دار می‌تواند

www.SID.ir

Archive of SID

توسط نفوذ بالا از این نوع سلول به بافت همبند، معده و آبشش‌ها در زمان عفونت‌های باکتریایی اتفاق بیفتد (۲۷).

کاهش معنی‌دار میـزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسـفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل مشـاهده شـد. این آنزیم‌ها شاخص‌ها سـلامت هپاتوپانکراس محسوب می‌شـوند و در حیواناتـی که هپاتوپانکراس آن‌ها آسـیب دیده اسـت به همولنف رها می‌شوند (۲۳). Vargas-Albores و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۴۴) کاهـش فعالیت ایـن دو آنزیم را در میگوی سـفید *Litopenaeus vannamei* که از مخلوط پروبیوتیکی استفاده کرده بودند را گزارش دادند.

از جمله مکانیسم‌هایی که منجر به افزایش روند رشد در میگو می‌شود، افزایش آنزیم‌های گوارشی است. آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که دارای انواع روده‌ای، اسـتخوانی و کبدی اسـت و نوع روده‌ای آن از بافت داخل روده‌ها ترشح می‌گردد. میزان این آنزیم در روده بیانگر وضعیت فعالیت روده می‌باشـد. مطالعات انجام شده توسـط برخی محققان حاکی از این مطلب می‌باشـد که میزان تغییرات سطح آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند وضعیت شـیمیایی آب میزان جذب غذا، مصرف و نوع غذا، دما و سن و به علاوه ترکیبات موجود در جیره غذایی به‌ویژه، فسفر می‌باشد (۳۹). میـزان این آنزیم از لحاظ عددی در تیمار حاوی پروبیوتیک تجاری، کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی و نیز تیمار شاهد بوده است ولی از لحاظ آماری این فاکتور معنی‌دار نشد ($P>0/05$).

اگر چه آلکالین فسـفاتاز در بسیاری از گونه‌های جانوری ردیابی شده اسـت، اما اطلاعات دقیق در مورد آن در بی‌مهرگان محدود اسـت. اخیراً ایـن آنزیم در سخت‌پوسـتانی مانند خرچنگ بهـار (spring lobster)، خرچنگ منزوی (Hermit (crab، خرچنگ دراز آب شیرین (cray fish) و میگوی جاوالا (Jawala shrimp) نشان داده شده است (۶).

در مجمـوع نتایج این مطالعه حاکی از آن اسـت که باسـیلوس‌های پروبیوتیکی منجر به ارتقای عملکرد رشـد، افزایش پارامترهای همولنفی و کاهش سطح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و اسپارات آمینوترانسفراز شده است. بنابراین پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی مناسبی در جهت بهبود شرایط پرورشی میگوی سفید غربی محسوب می‌شوند. لازم به ذکر است که در بین تیمارهای پروبیوتیکی، پروبیوتیک‌های تجاری عملکرد بهتری در مقایسـه با پروبیوتیک‌های بومی از خود نشان دادند. در حالیکه Ghosh و همکاران در سـال ۲۰۰۲ در تحقیق خود بیان داشتند که باکتری‌های جدا شـده از دسـتگاه گوارش فیل ماهی عملکرد بهتری نسبت به نوع تجاری آن بر ماهی داشتند (۱۳)، همچنین Jafaryan و همکاران در سال ۲۰۱۱ باکتری‌های زیست یار بومی را نسبت به غیر بومی کارآمدتر دانستند (۱۹). تفاوت در عملکردهای متفاوت باکتری‌های زیست یار می‌تواند به ژنتیک، تغذیـه و فاکتورهای محیطی برگـردد(۳). البته تفاوت در شـرایط محیط گوارشـی ماهی (محل جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بومی) و میگو، و یا استفاده از سویه‌های برتر در پروبیوتیک تجاری نیز می‌تواند از جمله علل تفاوت عملکرد پروبیوتیک‌ها تجاری و بومی باشد.

تشکر و قدردانی

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

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Abdollahi Arpanahi, D., Jafaryan, H., Soltani, M., GholipourKanani, H. (2014). The effect of Bacillus probiotics on the growth performance, survival rate and stress resistance of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) post larvae. JFST, 3, 33-45.
2. Akrami, R., Ghelichi, A., Ahmadifar, E. (2011). Effect of dietary prebiotic inulin on hematological and biochemical parameters of cultured juvenile Beluga (*Huso huso*). J Vet Res, 2, 131-136.
3. Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J.L., Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278, 188-191. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014
4. Blaxhall, P. C. (1972). The hematological assessment of the health of freshwater fish. Review of selected literature. J Fish Biol, 4, 593-604. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05704
5. Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2009). Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture, 294, 306-313. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.016
6. Chander, R., Thomas, P. (2001). Alkaline phosphatase from jawala sifrimp (Acetes indicus). J Food Biochem, 25, 91-103. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00726.x
7. Cheng, S. Y., Chen, J. C. (2002). Joint action of

www.SID.ir

Archive of SID

elevated ambient nitrite and nitrate on hemolyph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp penaeus monodon. CBP, 131, 303-314. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00004-2

8. Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., Hulata, G. (2004). Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. Aquac Res, 35, 1434-1440. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2109.2004.01167.x
9. De-Vrese., M, Marteau., PR.(2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. J Nutr, 137, 803-811. https://doi.org/10.1093/jn/137.3.803S
10. Farzanfar A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol Med Microbiol, 48, 149-158. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x
11. Fotedar, S., Tsvetnenko, E., Evans, L. (2001). Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus cygnus*. Mar Freshwater Res, 52, 1351-1355. https://doi.org/ 10.1071/MF01098
12. Fotedar, S., Evans, L., Jones, B. (2006). Effect of holding duration on the immune system of western rock lobster, *Panulirus cygnus*. CBP, 143, 479-487. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.010
13. Ghosh, k., Sen, S.K., Ray, A. K. (2002). Characterization of Bacillus Isolated from the gut of Rohu, Labeo rohita, fingerlings and its significance in digestion. J Appl Aquac, 12, 33-42. https://doi.org/10.1300/J028v12n03_04
14. Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013
15. Hai, N. V., Fotedar, R. (2009). Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos® and β-1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). Aquaculture, 289, 310-316. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.001
16. Hose, J. E., Martin, G. G., Gerard, A. S. (1990). A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. Biol Bull-US, 178, 33-45. https://doi.org/10.2307/1541535
17. Hosseinifar,H., Mirvaghefi, A., Majazi Amiri, B, khoshbavar Rostami, H., Darvish Bestami, K. (2011). The effect of oligoferoctos on some of hematological, serum biochemical parameters and liver enzymes of *Huso huso* fry (*Huso huso* Linnaeus, 1758). JIFRO, 20, 27-36. (in Persian). https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00828.x
18. Hsieh, S. L., Ruan, Y. H., Li, Y. C., Hsieh, P. S., Hu, C. H., KUO, C. M. (2008). Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture, 275, 335-341. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.019
19. Jafaryan, H., Soltani, M., Taati, M., Nazarpoor, A., Morovat, R. (2011). The comparison of pereformance of isolated sturgeon gut bacillus (*Acipenser persicus* and *Huso huso*) with commercial microbial products on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykis*) larvae. J Vet Res, 66, 39-46. (in Persian)
20. Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. (2000). Crustacean hemocytes and hematopoiesis. Aquaculture, 191, 45-52. https://doi.org/ 10.1016/S0044-8486(00)00418-X
21. Jussila, J., Jago, J., Tsvetnenko, E., Dunstan, B., Evans, L. H. (1997). Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus*) under postharvest stress. Mar Freshwater Res, 48, 863-867. https://doi.org/10.1071/MF97216
22. Kongnum, K., Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish & Shellfish Immunol, 32, 170-177. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.008
23. Kumar, V., Makkar, HPS., Becker, K. (2011).

www.SID.ir

Archive of SID

Nutritional, physiological haematological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juvenile fed detoxified jatropha curcas kernel meal. Aquac Nutr, 17, 415–467. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00825.x

24. Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., Hong, H. (2007). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Biotechnol Lett, 29, 525–530. https://doi.org/10.1007/s10529-006-9291-4
25. Lin, H.Z., Guo, Z.X., Yang, Y.Y., Zheng, W.H., Li, Z.J. (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquac Res, 35, 1441-1447. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01169.x
26. Makridis, P., Bergh, Q., Skjermoj, J., Vadstein, O. (2001). Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. Aquac Int, 9, 225- 235. https://doi.org/10.1023/A:1016815929846
27. Moriarty, D.J.W. (1996). Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. Infofish Int, 4, 29–33.
28. Moriarty, D.J.W. (1998). Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, 164, 351–358. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9
29. Mun˜oz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bache`re, E. (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. Eur J Biochem, 269, 2678- 2689. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x
30. Myner, K. (1993). Changes in serum protein composition occur in Attlantic salmon, *Salmo salar* L. during *Aeromonas salmonicida* infection. J Fish Dis, 16, 601- 604. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00897.x
31. Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J., 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. Mar Drugs, 9, 1119-1132. https://doi.org/10.3390/md9061119
32. Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A.A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214, 19–33. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00137-0
33. Ponce-Palafox, J., Martine-Palacios C.A., Ross, L.G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture, 157, 107–115. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00148-8
34. Postlethwaite, E., Mcdonald, D. (1995). Mechanisms of Na+ and C-regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. JEB, 198, 295-30. PMID: 9317841
35. Prodocimo, V., Galvez, F., Freire, C. A. Wood, CM. (2007). Unidirectional Na+ and Ca 2+ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol, 177, 519-28. https://doi.org/ 10.1007/s00360-007-0150
36. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitvorakul, S., Menasveta, P. (1998). Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167, 301-313. https://doi.org/ 10.1016/S0044-8486(98)00305-6
37. Saeed, Z.N., Mehran, H.R., Ghobad, A.T., Donald, L.L., Ali-Reza, M., Mehdi, S. (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. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021
38. Sknoberg, D. I., Yogev, L., Hardy, R.W., Dong, F. M. (1997). Metabolic response to dietary phosphorus intake in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 157, 11-24. 10. https://doi.

www.SID.ir

Archive of SID

org/1016/S0044-8486(97)00141-5

39. Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. Fish Shellfish Immunol, 15, 71–90. PMID: 12833917
40. Sritunyalucksana, K., Gangnonngiw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D., Flegel, TW. (2005). Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. Dis Aquat Organ, 63, 89–94. https://doi.org/10.3354/dao063089
41. Tseng, DY., Ho, PL., Huang, SY., Cheng, SC., Shiu, YL., Chiu, CS., Liu, CH. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*,by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish Shellfish Immunol, 26, 339-44. https://doi.org/ 10.1016/j.fsi.2008.12.003
42. Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaitre, B. (2002). How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol, 5, 102-110. PMID: 11834378
43. Van de Braak, K., Botterblom, M. H. A., Liu, W., Taverne, N., Van der Knaap,W. P. W., Rombout, J. H. W. M. (2002). The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Shellfish Immunol, 12, 253-272. https://doi.org/ 10.1006/fsim.2001.0369
44. Vargas-Albores, F., Martínez-Porchas, M., Arvayo, MA., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T. (2016). Immunophysiological Response of Pacific White Shrimp Exposed to a Probiotic Mixture of Proteobacteria and Firmicutes in Farm Conditions. N Am J Aquac, 78, 193–202. https://doi.org/ 10.1080/15222055.2016.1167797
45. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev, 64, 655-671. PMID:11104813
46. Vieira, F. N., Pedrotti, F. S., Neto, C. C. B., Mouriño, J. L. P., Beltrame, E., Martins, M. L., Ramirez, C., Arana, L. A. V. (2007). Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. Braz J Oceanogr, 55, 251-255. https://doi.org/10.1590/S1679-87592007000400002
47. Wang Y.B., Xu Z.R. (2007). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim Feed Sci Technol, 127, 283-292. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003
48. Wang, Y., Fu, L., Lin, J. (2012) Probiotic (Bacillus coagulans) cells in the diet benefit the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J Shellfish Res, 31, 855-860. https://doi.org/10.2983/035.031.0333
49. Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S. (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. Fish Sci, 71, 1036–1041. https://doi.org/ 10.1111/j.1444-2906.2005.01061.x
50. Williams, A.S., Davis, D.A., Arnold C.R. (1996). Density-dependent growth and survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in a semi-closed recirculating system. J World Aquacult Soc, 27, 107–112. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00600.x
51. Yang, S. P., Wu, Z. H., Jian, J. C., Zhang, X. Z. (2010). Effect of marine red yeast *Rhodosporidium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 309, 62-65. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.032
52. Yanbo W., Zirong X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim Feed Sci Technol, 127, 283-292. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003
53. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R., 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. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021

www.SID.ir

Comparision of Commercial and Indigenous Bacillus (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) Effects on Some Immune Responses and Serum Enzymes Activity in Whiteleg Shrimp Post-Larvae (*Litopenaeus vannamei*)

Daruosh Abdollahi Arpanahi[1], Hojatollah Jafaryan[1], Mehdi Soltani[2], Mahsa Naderi Samani[2], Ahmad Hasanpour Fatahi[1]

[1]*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Recources, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran*

[2]*Department of aquatic animal health, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

(Received 3 July 2018, Accepted 17 October 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Probiotics have more functional effects on shrimp immunological parameters but there is less information on comparative effects of Commercial and Indigenous probiotics on post-larvae and larval stage of shrimp life.

OBJECTIVES: This 60 day study was conducted to determine the effect of probiotic bacterium commercial and allochthonous (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on some of immune parameters and serum enzymes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

METHODS: Three experimental diets were supplemented with similar concentration of 1.5×106 Cfu/g by bacteria, commercial and allochthonous supplementation. Control (without probiotic supplementation), D1 (commercial probiotic), D2 (commercial+allochthonous probiotic) and D3 (allochthonous probiotic) were used for the experiment. At the end of trial, to evaluate immune parameters, Shrimp hemolymph was collected by syringe into the ventral sinus of *L. vannamei*, transferred to a tube and allowed to anticoagulant. To investigate serum enzymes level, body shrimp were homogenized and extracts were analyzed biochemically.

RESULTS: Total haemocyte count (THC), large granular cells (LGC), semi granular cells (SGC) and hyaline cells (HC) treated with commercial probiotics increased in comparison with control and significant difference was observed ($P<0.05$). Enzyme alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were significantly decreased in the experimental groups compared with control ($P<0.05$). However, post-larvae enzyme alkaline phosphatase was not found to be significantly affected by probiotic supplementation ($P>0.05$).

CONCLUSIONS: The probiotic Bacillus influenced the increase of the immune parameters haemolyph and decreased serum enzymes level and it is appropriate for supplementation in the diet of whiteleg shrimp post-larvae.

Keywords:

Probiotic, Immune parameters, Serum enzymes, *Litopenaeus vannamei*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Data of growth performance and survival rate of shrimps cultured with probiotics bacilli.

Table 2. Hemolymph metabolites values of shrimps fed with different probiotic supplements.

Table 3. Effect of treatment on enzyme activity of shrimps.

***Corresponding author's email: dabdollahi8@gmail.com, Tel: 021-61117195, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir