14(3) 253-260, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Study of different levels of *Lactobacillus spp* and *Bacillus spp* probiotics in larval-culture tanks on larvae quality indices of *Litopenaeus vannamei*

Mostafa Alishiri Joonaghani, Kamran Rezaei Tavabe*, Gholamreza Rafiee, Bahman Jamshidi

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Key Words

Probiotics
Bacillus
Lactobacillus
Litopenaeus vannamei

Abstract

Introduction: The past studies have shown that the use of some probiotics has improved growth, reproductive and immune systems in crustaceans. *Litopenaeus vannamei* is the most important culture species of crustaceans in the country and this shrimp grows better than other shrimps.

Materials & Methods: In this study, the effect of both probiotics based on quality indicators includes: larval stage index (LSI), larval condition index (LCI), larval dry weight, larval survival, Simultaneity of larval maturation to post larvae, time of emergence of first post larvae, duration of larval period and salinity and formalin stress tests in order to investigate Improvements in qualitative growth indices and immune system of Vanami shrimp larvae were examined. For this purpose, three concentrations of *Bacillus* probiotic with dose 6×10^5, 3×10^5 and 1×10^5 and three concentrations of *Lactobacillus* probiotic with dose 6×10^6, 3×10^6 and 1×10^6 were added to the water tank of Vanami shrimp larvae.

Results: The results showed that the larval quality indices at level 3 of both *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotics were the best response and respectively, respectively 67±3.2 and 62±7.28, dry weight 139±3.99 and 138±22.23, larval stage index 11.55±0.26 and 11.46±0.11, larval condition index 1.86±0.06 and 1.88±0.13, Simultaneity of larval maturation to post larvae 1.45±0.23 and 1.41±0.04, time of emergence of first post larvae 7.5±1.1 and 7.7±1.52, duration of larval period 8.91±0.73 and 9.11±0.6 and salinity and formalin stress tests also show significant differences for all indicators except dry weight index and time of emergence of the first larval post for Bacillus probiotic.

Conclusion: Finally, it can be concluded that the use of both probiotics increases growth, faster development, and longer survival and increases the resistance of the immune system.

* Corresponding Author's email: krtavabe@ut.ac.ir
Received: 6 July 2021; Reviewed: 6 August 2021; Revised: 7 October 2021; Accepted: 6 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.307114.2663

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف دو پروبیوتیک *Lactobacillus spp* و *Bacillus spp* در آب مخازن پرورش لارو بر شاخص‌های کیفی لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

مصطفی علیشیری‌جونقانی، کامران رضایی‌توابع*، غلامرضا رفیعی، بهمن جمشیدی

[۱] *گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران*

کلمات کلیدی

پروبیوتیک
باسیلوس
لاکتوباسیلوس
میگو پاسفید غربی

چکیده

مقدمه: پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در بهبود شاخص‌های رشد، تولیدمثلی و سیستم‌ایمنی در سخت‌پوستان و سایر آبزیان دارند. میگوی پاسفید غربی مهم‌ترین گونه پرورشی رایج در کشور است و تکثیر آن به‌صورت گسترده در مراکز تکثیر انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثرات دو پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس بر شاخص‌های کیفی شامل شاخص مرحله لاروی، شاخص وضعیت لاروی، وزن خشک لارو، درصد بازماندگی لارو، هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو، زمان رؤیت اولین پست‌لارو، طول دوره لاروی و تست‌های استرس شوری و فرمالین با هدف بررسی بهبود شاخص‌های کیفی رشد و ایمنی لارو میگو وانامی مورد بررسی قرار گرفت. برای این تحقیق، چهار تیمار شامل تیمار شاهد (بدون پروبیوتیک) و سه تیمار با سه سطح غلظت CFU/g ۱×۱۰^{۰} و ۳×۱۰^{۰} و ۶×۱۰^{۰} از پروبیوتیک باسیلوس و سه غلظت CFU/g ۱×۱۰^{۶} و ۳×۱۰^{۶} و ۶×۱۰^{۶} از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس به آب مخازن لاروی میگوی وانامی در طول یک دورهٔ لاروی اضافه شد.

نتایج: نتایج پژوهش نشان داد که شاخص‌های کیفی لاروی در سطح ۳ هر دو پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس بهترین پاسخ و به‌ترتیب ۶۲±۷/۲۸ و ۶۷±۳/۲ درصد بازماندگی، وزن خشک ۱۳۸±۲۲/۲۳ و ۱۳۹±۳/۹۹ میکروگرم، شاخص مرحله لاروی ۱۱/۴۶±۰/۱۱ و ۱۱/۵۵±۰/۲۶، شاخص وضعیت لاروی ۱/۸۸±۰/۱۳ و ۱/۸۶±۰/۰۶، همزمانی رسیدن لاروها به پست لارو ۱/۴۵±۰/۲۳ و ۱/۴۱±۰/۰۴ روز، زمان پیدایش اولین پست لارو ۷/۷۰±۱/۵۲ و ۷/۵۰±۱/۱۰ روز، طول دوره لاروی ۹/۱۱±۰/۶۰ و ۸/۹۱±۰/۷۳ روز و آزمون‌های استرس‌شوری و فرمالین نیز بیانگر تفاوت‌معنی‌دار برای همهٔ شاخص‌ها به‌جز شاخص وزن‌خشک و زمان پیدایش اولین پست‌لارو برای پروبیوتیک باسیلوس می‌باشند.

نتیجه‌گیری و بحث: براساس نتایج به‌دست آمده دو پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس باعث افزایش رشد، دگردیسی سریع‌تر، بازماندگی بیش‌تر و افزایش کیفیت تحمل به استرس در لارو میگوی پاسفید غربی می‌شوند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:krtavabe@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۵ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۵ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۵ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۵ آبان ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.307114.2663

مقدمه

آبزی‌پروری پایدار و موفق در گرو حفظ سلامت موجود آبزی و ایده‌آل‌سازی شرایط پرورشی برای کسب حداکثری رشد آبزیان و هم‌چنین کاهش هزینه‌های جانبی فرآیند تولید می‌باشد. از این‌رو پیوسته محققان و پرورش‌دهندگان در پی یافتن راهکارهای نوین و بهتر برای تحقق هدف آبزی‌پروری هستند. یکی از روش‌های ایده‌آل برای کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری، تقویت مکانیسم‌های دفاعی با مواد پیشگیرانه و تحریک‌کننده سیستم ایمنی می‌باشد. از جمله این مواد پروبیوتیک‌ها می‌باشند که به‌عنوان عامل بیولوژیکی موثر پذیرفته شده‌اند (۱). در واقع مشاهده صدمات و آثار سوء حاصل از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی کننده، نگاه محققان را به پروبیوتیک‌ها جلب کرد (۲). ایجاد خواص سلامت‌بخش پروبیوتیک‌ها اساساً مدیون اثرات سرکوب کننده آن‌ها بر فلور مضر روده و حفظ و بهبود توازن این فلور به نفع خود و یا ترشح ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها که مانع از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد، می‌باشد (۳). پروبیوتیک‌ها با تولیدات متابولیسمی، از تشکیل کلونی یا رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها جلوگیری نموده و با ایجاد رقابت برای کسب منابعی مانند مواد مغذی یا فضا از میزبان‌شان نسبت به عوامل بیماری‌زا حفاظت می‌کنند (۴). نتایج مطالعات نشان دادند که استفاده از بعضی از باکتری‌های استفاده‌شده به‌عنوان پروبیوتیک باعث ارتقای شاخص‌های تولیدمثلی، رشد و سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری در میگوها شده‌اند (۵). لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل، غیراسپورزا، کاتالاز و اکسیداز منفی و بی‌هوازی یا بی‌هوازی اختیاری هستند که به‌طور شاخص اسیدلاکتیک محصول نهایی فعالیت متابولیکی آن‌هاست (۶). لاکتوباسیلوس‌ها می‌توانند باعث کاهش آمونیاک آب، افزایش نرخ بقا، بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای در سخت‌پوستان شوند. هم‌چنین باکتری مذکور می‌تواند در فرایند حذف رقابتی موجب حذف پاتوژن‌های باکتریایی بیماری‌زا شود (۵). جنس باسیلوس شامل باکتری‌هایی بزرگ، گرم مثبت و میله ایی که اغلب هوازی اجباری یا بی هوازی اختیاری بوده و مطالعات گذشته نشان داده که استفاده از باسیلوس سبب بهبود فاکتورهای ایمنی و فلور میکروبی روده در آبزی‌پروری می‌شود (۷). میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مهم‌ترین گونه سخت‌پوست پرورشی رایج درکشور است. رشد این گونه نسبت به سایر گونه‌های پرورشی بهتر بوده، به‌نحوی‌که به ۳ گرم افزایش وزن در هفته و تا وزن ۲۰ گرم در پایان دوره می‌رسد (۸). از دیگر قابلیت‌های این میگو، می‌توان به تراکم‌پذیری بالا و تحمل دمای پایین آب، دامنه تحمل شوری بسیار وسیع از ۰/۵ تا ۴۵ قسمت در هزار، نیاز کم‌تر به پروتئین در جیره غذایی، امکان تهیه مولدین کارآمد از میگوهای پرورشی، تهیه مولدین SPF (Specific Pathogen Free) و SPR (Specific Pathogen Resistant)، بالا بودن نسبت بازماندگی پست‌لاروها و مقاومت نسبتاً مناسب این گونه نسبت به عوامل بیماری‌زا اشاره نمود (۹). این پژوهش با هدف بررسی تاثیر استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و باسیلوس در آب مخازن لاروی میگوی پاسفید غربی بر بهبود شاخص‌های کیفی لاروی انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این پژوهش دو پروبیوتیک باسیلوس (حاوی سویه‌های *B. subtilis* و *B. licheniformis*) و لاکتوباسیلوس (حاوی سویه‌های *L. casei* و *L. acidophilus*) از شرکت تک‌ژن تهران و هم‌چنین لاروهای مورد نیاز از شرکت هرمزلارو، واقع در بندر کوهستک شهرستان میناب استان هرمزگان پس از تکثیر ذخیره مولدین تهیه گردید. آزمایش در مخازن ۲۰ لیتری و با حجم ۱۰ لیتری از آب فیلتر و تصفیه شده مورد استفاده در کارگاه تکثیر با شوری ۳۰ قسمت در هزار، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد آبگیری شدند.

تهیه لاروهای مورد نیاز: پس از تخم‌ریزی مولدین ذخیره کارگاه و سپس تفریخ تخم‌ها و تبدیل شدن به ناپلیوس، با شمارش ناپلیوس‌ها به‌روش حجمی، با تراکم ۱۰۰۰ ناپلی در لیتر جداسازی و تا مرحله زوا ۱ نگه‌داری شد و سپس به تیمارهای آزمایشی اضافه و هوادهی انجام گردید. تغذیه لاروها از مرحله زوا ۱ هر ۴ ساعت با جلبک کتوسروس (Chaetoceros) انجام شد و سپس با استفاده از اسپرولینای (Spirulina) خشک و از مرحله زوا ۲ با ناپلی آرتمیا با تراکم ۱۵ عدد در میلی‌لیتر، در دو وعده صبح و عصر ادامه یافت.

افزودن پروبیوتیک به مخازن نگه‌داری لارو: غلظت مورد استفاده هر دو پروبیوتیک براساس نتایج مطالعات گذشته انتخاب شده است (۱۰، ۱۱). هم‌چنین مقادیر مختلف پروبیوتیک ابتدا در حجم کمی از آب خود مخازن حل شده است و سپس به مخزن اضافه شده است.

افزودن پروبیوتیک باسیلوس: آزمایش شامل چهار تیمار؛ تیمار شاهد، بدون پروبیوتیک و سه تیمار دیگر شامل سه غلظت پروبیوتیک باسیلوس، 1×10^5 CFU/g (سطح۱) و 3×10^5 (سطح۲)، 6×10^5 (سطح۳) بود که به آب مخازن لاروی میگوی وانامی اضافه گردید و تأثیر آن بر تغییر شاخص‌های لاروی میگوی وانامی مورد سنجش قرار گرفت.

افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس: در این آزمایش نیز تیمارها شامل؛ یک تیمار شاهد، بدون پروبیوتیک و سه تیمار دیگر شامل سه غلظت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس 1×10^6 CFU/g (سطح

۱) و ۳×۱۰۶ (سطح۲) ،۶×۱۰۶ (سطح۳) گردید که به آب مخازن لاروی میگوی وانامی اضافه و اثرات آن بر شاخص‌های لاروی میگوی وانامی مورد ارزیابی قرار گرفت.

شاخص‌های کیفی مورد بررسی مراحل لاروی میگو پا سفید غربی

شاخص مرحله لاروی (LSI: larval stage index): اندازه‌گیری شاخص مرحله لاروی براساس دستورالعمل Uno و Know انجام شد (۱۲). در این روش در روز نهم پرورش لاروی از هر تیمار تعداد ۳۰ قطعه لارو انتخاب شدند و شاخص تکوینی لاروی طبق معادله زیر محاسبه گردید: $LSI=\sum Si/N$

شاخص وضعیت لاروی (LCI: larval condition index): جهت اندازه‌گیری شاخص لاروی در روز نهم پرورش لاروی از هر تیمار تعداد ۳۰ قطعه لارو انتخاب شدند و شاخص وضعیت آن‌ها طبق رابطه تایمن و براون به‌صورت زیر محاسبه شد: $CI = \Sigma P. (10N)-1$

وزن خشک لارو: وزن خشک براساس دستورالعمل Nhan و Tom، با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد (۱۳). بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مطالعه ۳۰ قطعه لارو در پایان دوره لاروی نمونه برداری و وزن خشک تعیین شد.

درصد بازماندگی لارو: درصد بازماندگی لاروها بر اساس دستورالعمل New و William، انجام شد(۱۴). براساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مورد مطالعه ۳۰ قطعه لارو در پایان دوره لاروی نمونه‌برداری و درصد بازماندگی آن‌ها محاسبه شد.

هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (Ts): جهت محاسبه این شاخص، مدت زمانی که طول کشیده تا ۹۰ درصد لاروها به پست لارو تبدیل شوند را از مدت زمانی که طول کشیده تا ۱۰ درصد لاروها به پست‌لارو تبدیل شوند با استفاده از رابطه زیر از هم کم کرده و شاخص مورد نظر را محاسبه می‌کنیم: $TS=T90-T10$

زمان رؤیت اولین پست‌لارو: جهت محاسبه این شاخص، با توجه به بررسی مداوم تیمارها در پایان مراحل لاروی (مایسیس ۲ و ۳)، پس از مشاهده اولین پست‌لاروها، مدت زمان پیدایش اولین پست لارو از زمان تفریخ تا PL۱ ثبت گردید.

طول دوره لاروی: این شاخص با اندازه‌گیری مدت زمانی (روز) که لاروها به‌طور کامل به پست‌لارو تبدیل می‌شوند (شامل طول مرحله ناپلیوس، زوا و مایسیس)، انجام گردید.

تست‌های استرس: تست‌های استرس شوری و فرمالین در مرحله PL۱ انجام شد. بدین‌منظور تعداد ۳۰ عدد لارو از هر تیمار برداشت نموده و در مخازن کوچک و مجدداً در ۲ تکرار ۳۰ عددی در معرض شوری ۱۰ قسمت در هزار و فرمالین ۱۰۰ قسمت در میلیون به مدت ۶۰دقیقه قرار گرفتند. در پایان هر مرحله تلفات لاروها شمارش و ثبت شده و درصد بقا محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار SPSS-22 و Exel-2016 انجام شد. پس از بررسی نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده‌از آزمون کولموگروف‌اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها با آزمون لون (leven)، برای بررسی اختلاف معنی‌دار از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA)، لازم به ذکر است در کلیه نمودارها و جداول حروف‌لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P<0/05$). هم‌چنین تمامی مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام گردید.

نتایج

شاخص مرحله لاروی (LSI)

***Bacillus ssp*:** شاخص مرحله لاروی (LSI) طی روز نهم لاروی برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف تیمار پروبیوتیک باسیلوس در روز نهم لاروی اختلاف معنی‌داری بین تیمار کنترل با سطح ۲ و سطح ۳ نشان داد. بیش‌ترین مقدار LSI نیز مربوط به سطح ۳ و کم‌ترین مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف تیمار پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در روز نهم لاروی اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با سطح ۱، سطح ۲ و سطح۳ نشان داد. بیش‌ترین مقدار LSI نیز مربوط به سطح ۳ و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۲).

شاخص وضعیت لاروی (LCI)

***Bacillus ssp*:** شاخص وضعیت لاروی طی روز نهم لاروی برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف تیمار باسیلوس در روز نهم لاروی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در شاخص وضعیت لاروی بین تیمار شاهد با تمامی سطوح پروبیوتیک باسیلوس بود. بیش‌ترین مقدار LCI مربوط به سطح ۳ و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده از شاخص وضعیت لاروی برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس در روز نهم نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با سایر تیمارها بود. بیش‌ترین مقدار LCI نیز مربوط به سطح ۳ و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۲).

وزن خشک لارو

***Bacillus ssp*:** شاخص وزن خشک در پایان دوره لاروی برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک باسیلوس نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس نشان داد که بیش‌ترین مقدار وزن خشک در تیمار سطح ۳ (۱۳۹ میکروگرم) بوده که دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد که کم‌ترین مقدار وزن خشک (۱۱۲ میکروگرم) را نشان داد، بود (جدول ۲).

درصد بازماندگی لارو

***Bacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک باسیلوس که بیش‌ترین مقدار مربوط به سطح۳ (۶۲درصد) و کم‌ترین مقدار مربوط تیمار شاهد (۳۰ درصد) بوده و نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با سطح ۲ و سطح ۳ بوده ولی با سطح ۱ فاقد اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس که بیش‌ترین مقدار مربوط به سطح ۳ (۶۷ درصد) و کم‌ترین مقدار مربوط تیمار شاهد (۳۴ درصد) بوده و نتایج حاصله نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با سطح ۲ و سطح ۳ بوده ولی با سطح ۱ اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین میزان بازماندگی بین سطح ۲ و سطح ۳ نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۲).

هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (Ts)

***Bacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک باسیلوس نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بود که کم‌ترین مقدار آن در سطح ۳ (۱/۴۵ روز) مشاهده گردید و دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (۱/۸۷ روز) بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** شاخص هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (Ts) برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی بوده که کم‌ترین مقدار آن در سطح ۳ (۱/۴۱ روز) مشاهده گردید و دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (۱/۹۱ روز) بود (جدول ۲).

زمان پیدایش اولین پست‌لارو

***Bacillus ssp*:** شاخص زمان پیدایش اولین پست‌لارو برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک باسیلوس نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی بود (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی بوده که کم‌ترین مقدار آن در سطح ۳ (۷/۵ روز پس از تفریخ) مشاهده گردید و دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (۸/۸ روز پس از تفریخ) بود (جدول ۲).

طول دوره لاروی

***Bacillus ssp*:** شاخص طول دوره لاروی از زمان تفریخ تخم‌ها و تبدیل شدن به ناپلیوس ۱ تا پایان مرحله مایسیس ۳ و تبدیل شدن به لارو پیشرفته یا همان پست‌لارو برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک باسیلوس نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با سطح ۲ و سطح ۳ بوده ولی با سطح ۱ اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین بیش‌ترین طول دوره لاروی در تیمار شاهد (۱۰/۵ روز) و کم‌ترین مقدار آن در تیمار سطح ۳ (۹/۱ روز) مشاهده گردید (جدول ۱).

***Lactobacillus ssp*:** نتایج به‌دست آمده برای سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با سطح ۲ و سطح ۳ بوده ولی با سطح ۱ اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین بین سطح ۱ با سطح ۲ و ۳ نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد. هم‌چنین بیش‌ترین طول دوره لاروی در تیمار شاهد (۱۰/۵ روز) و کم‌ترین مقدار آن در تیمار سطح ۳ (۸/۹ روز) مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۱: شاخص‌های کیفی مورد مطالعه لارو میگوی پا سفید غربی برای پروبیوتیک *Bacillus ssp*.

پارامترها	شاهد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
بازماندگی (درصد)	۳۰±۴/۴۵^{a}	۳۷±۱/۹۵^{a}	۵۸±۵/۳۰^{b}	۶۲±۷/۲۸^{b}
وزن خشک (میکروگرم)	۱۱۰±۹/۲۷^{a}	۱۱۵±۲/۱۶^{a}	۱۲۷±۱۱/۶۸^{a}	۱۳۸±۲۳/۲۲^{a}
شاخص مرحله لاروی	۱۰/۸۶±۰/۲۸^{a}	۱۱/۰۵±۰/۱۳^{ab}	۱۱/۲۰±۰/۶۰^{b}	۱۱/۴۶±۰/۱۱^{c}
شاخص وضعیت لاروی	۱/۳۹±۰/۱۱^{a}	۱/۵۱±۰/۲۳^{b}	۱/۶۸±۰/۲۸^{c}	۱/۸۸±۰/۱۳^{d}
هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست لارو	۱/۸۷±۰/۶۰^{a}	۱/۷۹±۰/۱۸^{ab}	۱/۶۲±۰/۸۰^{bc}	۱/۴۵±۰/۲۳^{c}
زمان پیدایش اولین پست لارو (روز)	۸/۷±۰/۷۵^{a}	۸/۳±۱/۶۶^{a}	۸/۱±۰/۹۵^{a}	۷/۷±۱/۵۲^{a}
طول دوره لاروی (روز)	۱۰/۵۱±۰/۲۱^{a}	۱۰/۱۱±۰/۰۲^{ab}	۹/۶۰±۰/۲۸^{bc}	۹/۱۱±۰/۶۰^{c}

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵).

جدول ۲: شاخص‌های کیفی مورد مطالعه لارو میگوی پا سفید غربی برای پروبیوتیک *Lactobacillus ssp*.

پارامترها	شاهد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
بازماندگی (درصد)	۳۴±۲/۱۲^{a}	۴۰±۱/۵۵^{a}	۵۲±۸/۴۰^{b}	۶۷±۳/۲۳^{c}
وزن خشک (میکروگرم)	۱۱۲±۱۰/۴۵^{a}	۱۱۶±۴/۸۵^{a}	۱۳۱±۹/۲۹^{ab}	۱۳۹±۳/۹۹^{b}
شاخص مرحله لاروی	۱۰/۵۷±۰/۲۳^{a}	۱۱/۱۳±۰/۱۵^{b}	۱۱/۱۵±۰/۱۹^{b}	۱۱/۵۵±۰/۲۶^{c}
شاخص وضعیت لاروی	۱/۳۸±۰/۰۹^{a}	۱/۵۷±۰/۰۳^{b}	۱/۷۱±۰/۱۲^{b}	۱/۸۶±۰/۰۶^{c}
هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست لارو	۱/۹۱±۰/۳۳^{a}	۱/۸۳±۰/۳۴^{ab}	۱/۶۶±۰/۰۹^{ab}	۱/۴۱±۰/۰۴^{b}
زمان پیدایش اولین پست لارو (روز)	۸/۸±۰/۶۸^{a}	۸/۷۱±۰/۱۴^{a}	۷/۷±۰/۲۲^{b}	۷/۵±۱/۱۰^{b}
طول دوره لاروی (روز)	۱۰/۵۲±۰/۳۴^{a}	۱۰/۵۱±۰/۰۴^{a}	۹/۲۰±۰/۲۲^{b}	۸/۹۱±۰/۷۳^{b}

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵).

تست‌های استرس شوری و فرمالین

Bacillus ssp: میانگین درصد بقا لاروها در مرحله PL_{1} با تست شوری ۱۰ قسمت در هزار و فرمالین ۱۰۰ قسمت در میلیون در زمان ۶۰ دقیقه در جدول ۲ ارائه گردید. میانگین درصد بقا در تست شوری ۱۰ قسمت در هزار دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر بوده و بیش‌ترین آن در سطح ۳ (۵۶/۶۶ درصد) مشاهده گردید که با تیمار شاهد (۳۰ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در تست استرس فرمالین نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده گردید که بیش‌ترین آن در سطح ۳ (۶۶/۳۳ درصد) بوده که با تیمار شاهد (۴۶/۶۶ درصد) اختلاف معنی‌داری را نشان داد ولی کم‌ترین مقدار آن در سطح ۱ (۴۳/۳۳ درصد) مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳: تست‌های استرس شوری و فرمالین پروبیوتیک *Bacillus ssp* مورد مطالعه لارو میگوی پا سفید غربی

تیمارها	درصد بقا (Mean±SD)
تست شوری (۱۰ قسمت در هزار)	
شاهد	۳۰/۰۰±۱/۷۳^{a}
سطح۱	۳۳/۳۳±۳/۰۵^{ab}
سطح۲	۴۳/۳۳±۶/۵۰^{b}
سطح۳	۵۶/۶۶±۳/۵۱^{c}
تست فرمالین (۱۰۰ قسمت در میلیون)	
شاهد	۴۶/۶۶±۵/۵۰^{ab}
سطح۱	۴۳/۳۳±۴/۱۶^{a}
سطح۲	۵۶/۶۶±۱۰/۰۶^{bc}
سطح۳	۶۳/۳۳±۴/۵۰^{c}

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (P<۰/۰۵).

Lactobacillus ssp: میانگین درصد بقا لاروها در مرحله PL_{1} با تست شوری ۱۰ قسمت در هزار و فرمالین ۱۰۰ قسمت در میلیون در زمان ۶۰ دقیقه در جدول (۳) ارائه گردید. میانگین درصد بقا در تست شوری ۱۰ قسمت در هزار دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر بوده و بیش‌ترین آن در سطح ۳ (۵۳/۳۳ درصد) مشاهده گردید که با تیمار شاهد (۳۳/۳۳ درصد) دارای تفاوت معنی‌داری است. در تست استرس فرمالین نیز تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده گردید که بیش‌ترین آن در سطح ۲ و سطح ۳ (۶۳/۳۳ درصد) بوده که با تیمار شاهد (۵۰ درصد) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۴).

جدول۴: تست‌های استرس شوری و فرمالین پروبیوتیک *Lactobacillus ssp* مورد مطالعه لارو میگوی پا سفید غربی

تیمارها	درصد بقا (Mean±SD)
تست شوری (۱۰ قسمت در هزار)	
شاهد	۳۳/۳۳±۱۱/۷۱^{ab}
سطح۱	۳۰/۰۰±۵/۰۰^{a}
سطح۲	۴۶/۶۶±۴/۰۴^{b}
سطح۳	۵۳/۳۳±۴/۹۳^{c}
تست فرمالین (۱۰۰ قسمت در میلیون)	
شاهد	۵۰/۰۰±۷/۰۰^{a}
سطح۱	۵۳/۳۳±۲/۳۰^{a}
سطح۲	۶۳/۳۳±۸/۵۰^{b}
سطح۳	۶۳/۳۳±۲/۰۸^{b}

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (P<۰/۰۵).

بحث

دستگاه گوارش سخت‌پوستان یکی از مسیرهای مهم برای ورود عوامل بیماری‌زا به بدن است و دارای تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. جمعیت‌های میکروبی روده سخت‌پوستان نسبت به محیط آبی اطراف آن‌ها بسیار بیش‌تر می‌باشند (۱۵). مشابه سایر موجودات آبزی، میگوی پاسفید غربی نیز دارای ارتباط تنگاتنگی با میکروارگانیسم‌های محیط آبی اطراف می‌باشد. بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها برای تعادل میکروفلور روده و مطلوب نمودن عملکرد

روده‌ای منجر به افزایش نرخ رشد و به حداکثر رساندن کارایی در مزارع پرورش میگو می‌گردد (۱۶). بنابراین با افزایش رشد انتظار می‌رود سایر شاخص‌های وابسته به رشد مانند وزن خشک لارو، طول دوره لاروی، زمان پیدایش اولین پست‌لارو، شاخص وضعیت لاروی (LCI) و شاخص مرحله لاروی (LSI) نیز بهبود پیدا کنند. در مطالعات مختلف، اثرات افزودن پروبیوتیک‌ها بر کیفیت آب پرورش آبزیان مورد بررسی قرار گرفته است که به‌طورکلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کارایی بیش‌تری در معدنی کردن مواد آلی دارند (۱۷). به‌نظر می‌رسد که استفاده از سطوح بالاتر باکتری‌های گرم‌مثبت در پرورش آبزیان می‌تواند کربن آلی را در طی چرخه پرورش به دی‌اکسیدکربن تبدیل کرده و تولید فیتوپلانکتون‌ها را افزایش دهد. هم‌چنین مکانیسم‌های عملکردی برای کارایی پروبیوتیک معرفی شده است که ازجمله این راهکارها شامل چسبیدن به دیواره دستگاه گوارش برای جلوگیری از کلونیزه شدن عوامل بیماری‌زا، خنثی‌سازی سموم، فعالیت باکتریوسین‌ها و افزایش توانایی سیستم ایمنی بدن می‌باشد (۱۸). هم‌چنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق محدودکردن باکتری‌های مضر و با تولید ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها، سیدروفرها، لیزوزیم‌ها، پروتئازها، هیدروژن پراکسیدها و جلوگیری از اتصال و کلونی‌سازی باکتری‌های مضر در روده، رقابت جهت مصرف مواد مغذی و ارتقای سیستم ایمنی آبزی به‌وسیله تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و فعالیت ضدویروسی قادر به افزایش بقای آبزیان باشند (۱۹). ارتقای نرخ بقا در میگوهای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی ممکن است به واکنش ایمنی پروبیوتیک‌ها بر میزبان مرتبط باشد. داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس در آب مخازن لاروی میگوی وانامی، سبب افزایش شاخص مرحله لاروی (LSI) و شاخص وضعیت لاروی (LCI) و هم‌چنین افزایش درصد بقا در تیمار سطح ۳ از هر دو پروبیوتیک تحت تنش‌های شوری و فرمالین بیانگر تاثیر مطلوب این باکتری‌های سودمند بر سیستم‌ایمنی لارو میگوی پاسفید غربی می‌باشد. استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند سبب بهبود تعادل میکروبی روده، بهبود فاکتورهای کیفی آب محیط پرورش، بهبود وضعیت سیستم ایمنی، بهبود کارایی تغذیه‌ای و هضم غذا، افزایش رشد و پوست‌اندازی و به‌دنبال آن شاخص مرحله تکوینی لارو نیز بهبود یافته است. پروبیوتیک‌های باسیلوس در روده آنزیم‌هایی را که در هضم یا جذب مواد اساسی دخیل هستند را تولید یا ترشح آن‌ها را تحریک می‌کند (۲۰). استفاده از پروبیوتیک باسیلوس، میزان بقا، پروتئاز و آمیلاز را در مقایسه با تیمارهای بدون پروبیوتیک افزایش می‌دهد (۲۱). نتایج این مطالعه درخصوص بهبود فاکتورهای رشد و بازماندگی در برخی تیمارهایی که تحت تاثیر پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس قرار گرفته‌اند با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد، به‌طور مثال در پژوهشی اثر مثبت باسیلوس‌ها در میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) موجب افزایش ۲۳ درصد وزن شده (۲۰). هم‌چنین در مطالعه‌ای مشابه باسیلوس‌ها تفاوت معنی‌داری پس از ۵۶ روز استفاده در میگوی وانامی نشان دادند (۲۲). مطالعات متعدد دیگری اثرات سودمند لاکتوباسیلوس‌ها را بررسی کرده‌اند به‌طور مثال در مطالعه‌ای تاثیرات مثبت باسیلوس‌ها در ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) بر روی پارامترهای رشد و ضریب تبدیل غذایی شد (۲۳). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر دریافتند که افزودن لاکتوباسیلوس‌ها به جیره غذایی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) باعث بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش میزبان به سمت باکتری‌های تخمیر کننده می‌شوند که این جایگزینی باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش میزبان به‌دلیل رقابت برای محل استقرار و غذا بوده و باعث کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش و کاهش صرف انرژی جهت مقابله میزبان با باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش احتمال ابتلا به بیماری می‌شود. با این‌حال اختلاف در نتایج مطالعات انجام شده در زمینه پروبیوتیک‌ها وجود دارد که می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه پرورشی، اندازه، سن، مرحله به‌کارگیری پروبیوتیک، طول دوره پرورش، شرایط بهداشتی و سیستم پرورشی، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص آن‌ها و میزان به‌کارگیری آن‌ها در جیره مصرفی، روش‌های افزودن آن‌ها به جیره و میکروبیوتای روده گونه پرورش دارد (۲۴). به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد سویه‌های پروبیوتیک به‌کار رفته در این تحقیق تاثیر مثبتی بر شاخص‌های کیفی شامل شاخص مرحله لاروی، شاخص وضعیت لاروی، درصد بازماندگی لارو، هم‌زمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو، طول دوره لاروی و مقاومت در برابر استرس شوری و فرمالین به‌خصوص در غلظت‌های بالاتر پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد داشته است.

منابع

1. **Shigeno, T., 1995.** The effect of bosentan, a new potent endothelin receptor antagonist, on the pathogenesis of cerebral vasospasm. Neurosurgery. 37(1): 87-9116.

2. **Seenivasan, C., Saravana Bhavan, P. and Radhakrishnan, S., 2011.** Effect of probiotics (BinifitTM) on survival, growth, biochemical constituents and energy budget of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. Elixir Aquaculture. 41: 5919-5927.

3. **Falakzadeh, N., Mooraki, N., Anvar, A.A. and Kakoolaki, Sh., 2015.** Effects of a probiotic, Pediococcus acidilactici on the growth performance and hematological parameters in the fingerling, Severum (*Heros severus*). Journal of Animal Environment. 7(2): 211-220. (In Persian)

4. **Vine, N., Leukes, W. and Kaiser, H., 2006.** Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiology Reviews. 30: 404-427.

5. **Nimrat, S., Tanutpongpalin, P., Sritunyalucksana, K., Boonthai, T. and Vuthiphandchai, V., 2013.** Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. Aquaculture International. 21: 655-666.

6. **Gatesoupe, F., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180(1-2): 147-165.

7. **Green, S., 1999.** Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. Journal of medical virology. 59(3): 329-334.

8. **Wyban, J. and Sweeny, G., 1991.** Shrimp health maintenance. Intensive shrimp production technology. The Oceanic Institute, Hawaii. 103-112.

9. **Briggs, M., 2004.** Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication. 10: 92.

10. **Raisi, H., Jafary, V., Ziaei Nezhad, S. and Pasandi, A.A., 2015.** Effect of probiotics (*B. licheniformis, Bacillus subti*) on density and growth parameter, caracase component in different density of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Animal Environment. 7(3): 199-204. (In Persian)

11. **Abdollahi Arpanahi, D., Jafaryan, H., Soltani, M. and Gholipour Kanani, 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. Journal of Fisheries Science and Technology. 3(1): 33-44. (In Persian)

12. **Uno, Y. and Kwon, C., 1969.** Larval development of *Macrobrachiurn rosenbergii* reared in the laboratory. Journal of the Tokyo University Fisheries. 55: 179-191.

13. **Nhan, R. and Tom, Ch., 2009.** Classifying affective states using thermal infrared imaging of the human race. IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 57(4): 979-987.

14. **New, W.H. and William, H., 2003.** A history of Canadian literature. Vol. 5149. McGill-Queen's Press-MQUP.

15. **Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K.F., Rossen, L., Nielsen, T. and Gram, L., 2004.** Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology. 96: 117-132.

16. **Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. And Chim, L., 2009.** Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture. 294: 306-313.

17. **Stanier, R., 1963.** The organization of the photosynthetic apparatus in purple bacteria. The general physiology of cell specialization. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York. 242-252.

18. **Fernandez, R., Sridhar, M. and Sridhar, N., 2011.** Effect of lactic acid bacteria administered orally on growth performance of *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) juveniles. Research Journal of Microbiology. 6(5): 466-479.

19. **Saurabh, S. and Sahoo, P., 2008.** Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. 39: 223-239.

20. **Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M., Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A. and 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.

21. **Talpur, A., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M. and Bolong, A., 2013.** Indigenous Lactobacillus plantarum as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus*

(Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. Aquaculture. 416: 173-178.

22. **Zokaeifar, H., Balcázar, J., Saad, C., Kamarudin, M., Sijam, K. and Arshad, A., 2012.** Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 33: 683-689.

23. **Hoseinifar, S., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish and Shellfish Immunology. 42: 533- 538.

24. **Ringo, E., Olsen, R., Gifstad, T., Dalmo, R., Amlund, H., Hemre, G. and Bakke, A., 2010.** Prebiotics in aquaculture: A review, Journal of Aquaculture Nutrition. 16: 117-136.