تاثیر جیره حاوی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* IS02 بر شاخص های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی

بابک قائدنیا [1]*، مریم میربخش [1] و سید محمد جلیل ذریه زهرا [1]

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۲

چکیده

در این پژوهش پروبیوتیک "تک‌سل" که بر اساس مطالعات ۸ ساله موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور (از ۱۳۸۸ لغایت ۱۳۹۵) در پژوهشکده میگوی کشور و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است، در جیره غذایی میگوهای پرورشی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزنی بیش از ۶ گرم افزوده شد (به سه مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg) و شاخص‌های سلامتی (شامل تعداد هموسیت کل، شمارش افتراقی هموسیت‌ها و میزان پروتئین پلاسما کل) میگوها در ابتدا و انتهای دوره آزمون، تعیین گردید. برای این منظور میگوها به صورت تصادفی انتخاب شده و در آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری (در هر اکواریوم ۳۰ قطعه) نگهداری شدند. میگوها در سه تیمار و هر کدام با سه تکرار تیماربندی شدند و کنترل منفی (تغذیه با جیره فاقد پروبیوتیک و عدم مواجهه با عامل بیماری) و کنترل مثبت (صرفاً مواجهه با عامل بیماری) منظور شد. در هر تیمار، میگوها سه بار در روز به مدت ۴۰ روز با غذای پلت حاوی پروبیوتیک تک‌سل تغذیه شدند و در طول آزمون، پارامترهای دما، شوری و اکسیژن ثبت گردد. پس از ۴۰ روز نیز مواجهه با ویروس لکه سفید انجام شده و به مدت ۲ هفته روزانه تلفات و درصد بازماندگی ثبت شد. پس از نمونه‌گیری همولنف، شاخص سلامت، شامل تعداد هموسیت کل (Total Hemocyte Count,THC)، شمارش افتراقی هموسیت‌ها (Differential Hemocyte Count ,DHC) و میزان پروتئین پلاسما کل (Total Plasma Protein,TPP) اندازه‌گیری و در تیمارها با گروه‌های شاهد مثبت و منفی، مقایسه گردید. بر اساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان بیان کرد که تغذیه میگوهای سفید غربی با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر 10^7 و 10^8 CFU/Kg موجب افزایش معنی‌دار ($P\leq0/05$) عملکرد سیستم ایمنی میگوها و شاخص‌های سلامتی می‌گردد. افزون بر این تغذیه با جیره‌های غذایی مورد اشاره، در افزایش درصد بازماندگی میگوهای مواجهه یافته با ویروس لکه سفید در مقابسه با شاهد، موثر می‌باشد ($P\leq0/05$).

کلمات کلیدی: میگوی سفید غربی، *Litopenaeus vannamei*، پروبیوتیک، شاخص‌های سلامتی، تعداد هموسیت کل، شمارش افتراقی هموسیت‌ها، میزان پروتئین پلاسما کل

* عهده‌دار مکاتبات (✉). babak.ghaednia@gmail.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

مقدمه

با پیشـــرفت تکنولوژی، اهمیت پارامترهای محیطی در سیستم‌های مدیریتی آشکار گردید و سیستم‌های مدیریتی با تاکید بیشتر بر پایش پارامترهای محیطی طراحی و اجرا شد. ولی علی‌رغم اعمال مدیریت‌های بهداشتی کامل، برخی از فشارهای محیطی مثل استرس هنگام انتقال لاروهای میگو از هچری به مزرعه اجتناب ناپذیر می‌باشد. برای کارآمد بودن هر روش کنترلی در مدیریت بیماری باید بکارگیری آن روش بخشی از سیستم مدیریت بهداشتی جامعی باشد که در استخر اعمال می‌شود. پروبیوتیک‌ها و محرک‌های سیستم ایمنی می‌توانند نقش مهمی در چنین سیستم‌هایی ایفا کنند (Bachère, 2000). پروبیوتیک یا Probiotics، Probiont، Probiotic bacteria و Beneficial bacteria واژه‌هایی هستند که مترادف یکدیگر بوده و همگی برای باکتری‌های پروبیوتیک استفاده می‌شوند.

پرورش میگو در سال‌های اخیر به یکی از عمده‌ترین فعالیت‌های اشتغال‌زا و سودآور در جهان تبدیل شده است، این صنعت در ایران از حدود ۲۰ سال پیش و با سرمایه‌گذاری بخش دولتی و خصوصی در استان بوشهر و پس از آن در سایر سواحل جنوبی کشور آغاز شد. بیماری‌های میگو همواره باعث ایجاد خسارات اقتصادی و اجتماعی زیادی به جامعه پرورش‌دهندگان و سایر حلقه‌های مرتبط در صنعت میگوی پرورشی شده است. در بین عوامل بیماری‌زا، ویروس لکه سفید بیماری‌زاترین عامل مرگ و میر و تلفات در میگوهای پرورشی است (Quang *et al.*, 2008).

بیماری‌های ویروسی خسارت زیادی را در تایوان، چین، اندونزی، ایران، هند، پاناما، هندوراس و اکوادور به صنعت آبزی پروری وارد کرده اند. به طور کلی می توان بیان کرد که نیمکره غربی با ویروسی که از شرق آمد، یعنی عامل بیماری لکه سفید، می‌جنگد و نیمکره شرقی با ویروسی که از غرب آمد یعنی عامل بیماری دم قرمز تورا[1] در ستیز است. برای درمان بیماری‌های ویروسی دارویی وجود ندارد ولی تکنیک‌های مدیریتی، اثرات ویروس‌ها را کاهش می‌دهد. هم اکنون تمامی مطالعات انجام شده در خصوص بیماری لکه سفید، لزوم بکارگیری ابزارهای مدیریتی پیشگیرانه برای کنترل آن را خاطرنشان می‌سازد. میزان برداشت میگوی پرورشی استان از سال ۱۳۷۴ لغایت ۱۳۸۳ از رشد مناسبی برخوردار بود؛ به طوری که در سال ۱۳۸۳ به ۵۶۰۰ تن رسید. میانگین وزنی اعلام شده تقریبا ۱۷ الی ۱۸ گرم بوده است که ارزش اقتصادی آن بالغ بر ۱۶۰ هزار میلیارد ریال می باشد، ولی در سال ۱۳۸۴ بدلیل بروز و شیوع بیماری لکه سفید (WSD) به حدود ۵۰۰ تن رسیده است. با توجه به پایین بودن میانگین وزنی میگوهای برداشت شده در این سال ارزش اقتصادی آن به حدود ۹۰ میلیارد ریال کاهش یافت (Salehi *et al.*, 2010).

در حال حاضر، پروبیوتیک‌های مرتبط با صنعت آبزیان، به طور وسیعی در امریکا، ژاپن، کشورهای اروپایی، اندونزی و تایلند تولید و استفاده می‌شوند. یکی از اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بهبود عملکرد ایمنی آبزیان پرورشی، در مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و در نهایت کاهش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، مواد شیمیایی و نیز پیشگیری از اپیدمی‌های ناگهانی

[1] Taura

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

بیماری‌ها گزارش شـده اسـت (وشـتانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ خانجانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Newman,1999). آبزی‌پروری در ایـران یکی از محورهـای توسـعه استان‌های جنوبی و شمالی کشور محسوب می‌شود ولی کاربرد و توسعه پروبیوتیک در صنعت آبزی‌پروری، در مقایسه با سایر کشورها، بسیار ناچیز است. از آن جهت کـه کنترل بیمـاری هـا نیـاز بـه اقـدامـات نوینی دارد که مقرون به صـرفه، موثر و سـازگار با محیط زیست باشند، اسـتفاده از باکتری‌های مفید (پروبیوتیک‌ها) در صـنعت پرورش آبزیـان به عنوان بهترین، ارزان‌ترین و موثرترین روش برای کنترل عوامل بیماریزا در مقایسه با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد (Salehi *et al*., 2010).

حسـن‌نیـا و همکـاران (۱۳۸۱)، به منظور تعیین اثر بـاکتری *Pseudomonas Fluorescenca* بر رشـد و بـقـای مـیگوی سـفیـد هنـدی (*Fenneropenaeus indicus*) در مرحله لاروی اولیه، پژوهشـی انجام دادند. اثر باکتری در آزمایش‌های مختلف به صـورت مکمل غـذای زنـده یـا جـایگزین جلبـک بر لارو میگو مورد مطـالعـه قرارگرفـت. آنهـا اعلام کردند که اسـتفاده از ۵۰mg/L باکتری *سـودوموناس فلورسـنس*، می‌تواند تا ۲۶۶٪ بقـاء، ۵۶٪ طول و۱۲۲٪ وزن را بهبود بخشـد. بر اسـاس مطالعات Jiravanichpasial و همکارانش در سال ۱۹۹۷ می‌توان از گونه‌های *Lactpbacillus spp.* به عنوان پروبیوتیـک در *Penaeus monodon* اسـتفاده کرد. در مطالعه‌ای که توسط Rengpipat در سال ۲۰۰۰ برای مطالعه بهبود عملکرد سـیسـتم ایمنی در میگوی ببری سیاه به وسـیله باکتری پروبیوتیک *Bacillus* S11 انجام شـد، نشـان داد که در میگوهای تغذیه شـده با این سـویـه، پارامترهای ایمنی به طور چشـمگیری افزایش یـافـت و همچنین موجـب بهبود نرخ رشـد شـد. در مطالعه‌ای دیگر یک سـویه از باسـیلوس موجب بهبود کیفیت آب و افزایش میزان رشد و بازماندگی میگوهای پنئوس مونودون جوان و کـاهش ویبریو هـای بیمـاریزا می‌شـود (Dalmin *et al*., 2001). بـا مطـالعـه Li و همکاران، در سـال ۲۰۰۷، بر روی اثرات گونه *باسیلوس لیکینیفرمیس*[1] بر روی فلور میکروبی روده و سـیسـتم ایمنی میگوی سـفید غربی مشـخص شـد *باسـیلوس لیکینیفرمیس* در پرورش میگوی سـفیـد غربی موجـب مهـار گونـه‌هـای *ویبریو* از طریق حذف رقابتی شـده و مـوجـب بـهـبود عملکرد ایمنی میگو شـد. بنـابراین *Bacillus licheniformis* مـی‌تـوانـد بـه عنوان یـک محرک سـیسـتم ایمنی در مکمـل‌هـای غـذایی مورد اسـتفاده در آبزی پروری، به منظور بهبود عملکرد ایمنی در میگوها، استفاده شود.

در سـال ۲۰۱۰a، Liu و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی تـاثیر پروبیوتیـک *Bacillus subtilis* E20 بر درصـد بازماندگی، رشـد، تحمل اسـترس و وضـعیت ایمنی در لاروهـای میگوی سـفید غربی انجام دادند، به این نتیجه رسـیدند که رشـد لارو میگوها به طور قابل مـلاحـظـه‌ای پـس از افـزودن پـروبـیوتیـک بـه میزان 10^9 CFU/ml افزایش یـافـت و درصـد بـازمـاندگی لاروهـای تیمار شـده با پروبیوتیک به میزان معنی‌داری بیشـتر از کنترل بود. بر اسـاس گزارش Zokaeifar و همکاران (۲۰۱۲) تغذیه میگوهای سفید غربی توسط دو سـویه *باسیلوی سابتیلیس* به مدت ۸ هفته و سپس بررسی اثر آنها در پیشـگیری از بروز ویبریوزیس نشـان داد که اسـتفـاده از این بـاکتری‌هـا سـبب افزایش وزن نهایی، ضریب رشد و فعالیت آنزیمی در مقایسه با گروه کنترل

1

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

گردید و همچنین ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی در میگوهایی که با دوز 10^8CFU/ml از باکتری‌ها تغذیه شده بودند اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. Mirbakhshو همکاران (۲۰۱۳)، در پژوهش برروی میگوی سفید غربی در استان بوشهر، پس از جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای موثر در تولید پروتیوتیک تاثیر هر یک از سویه‌های باکتریایی IS02 وIS03، به عنوان پروبیوتیک‌های بومی در آزمایش‌های انجام شده بر روی پست لارو میگوی سفید غربی اعلام کرد، درصد مرگ و میر تجمعی میگوهایی که با غذاهای حاوی پروبیوتیک، تغذیه شده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P\leq$۰/۰۵). در پژوهش حاضر تاثیر پژوهش سویه بومی باسیلوس سابتیلیس جدا شده از مزارع پرورش میگو بر شاخص‌های سلامتی میگوهای سفید غربی مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از مشکلات عمده در مطالعات مربوط به روش‌های مورد استفاده جهت بهبودِ مقاومتِ میگو در شرایط مختلف و تیمارهای مختلف، انتخاب فاکتورهای مناسب جهت تعیین سلامت میگو است، لذا در این مطالعه سه فاکتور THC، DHC و TPP برای این منظور در نظر گرفته شد (Sanchez *et al*,. 2001).

مواد و روش‌ها

سویه باکتری پروبیوتیک تک‌سل، باسیلوس سابتیلیس IS02 [1] (GenBank: JN856456.1) با دوز 10^{13}CFU/kg با فیلر کلسیم کربنات (نام تجاری تک‌سل- شرکت تک ژن زیست، ایران) می‌باشد.

تجهیزات و مواد مصرفی مورد استفاده عبارتند از سمپلر، اتوکلاو (ایران طب زعیم)، فور، هموژنایزر، انکوباتور یخچال‌دار (JSBI-250 C, JSR Inc, Korea)، انکوباتور شیکردار (JSSI-200CL, JSR Inc, Korea)، سانتریفیوژ یخچال‌دار (3-16PK, - Sigma Inc, Germany)، اسپکتروفتومتر (UV-Vis Spectrophotometer 6800 Jenway Inc, England)، هموژنایزر، هیتر، ترازو، هود لامینار، شوری‌سنج چشمی، پمپ هواده، پمپ کف‌کش، کلونی کانتر، دماسنج، فریزر ۲۰- و ۷۰- درجه سانتیگراد، آسیاب، همزن برقی، چرخ گوشت، پلیت ۸ سانتی‌متری، سر سمپلر زرد و آبی، میکروتیوب، پنبه، کووت، کلرید سدیم،آب مقطر، آب تصفیه شده دریا، فویل، محیط کشت Tryptice Soy Broth (Merk, Germany)، محیط کشت Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) (Merk, Germany).

این پژوهش در سالن مواجهه پژوهشکده میگوی کشور، در بوشهر و در اکواریوم‌های ۱۵۵ لیتری حاوی آب فیلتر شده و کلرزنی به مدت ۲ ماه شده انجام شده است و پروبیوتیک تک سل که که بر اساس مطالعات ۸ ساله پژوهشکده میگوی کشور (از ۱۳۸۸ لغایت ۱۳۹۵) و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است، در جیره غذایی میگوهای پرورشی سفید غربی با میانگین وزنی ۰/۸۹± ۷/۰۲ گرم افزوده شد (به سه مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8CFU/Kg) و شاخص‌های سلامت (شامل THC، TPP وDHC) میگوها در ابتدا و انتهای دوره آزمون، تعیین گردید. برای این منظور میگوها به صورت تصادفی انتخاب شده و در آکواریوم‌های ۱۵۵ لیتری (در هر اکواریوم ۳۰ قطعه) نگهداری و آداپته شدند. هر کدام از سه تیمار با سه تکرار تیماربندی شد و همچنین کنترل منفی (فاقد

[1] *Bacillus subtilis* IS02

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

پروبیوتیک و عامل بیماری) و کنترل مثبت (صرفاً پروبیوتیک) نیز منظور شد. در هر تیمار، میگوها سه بار در روز به مدت ۴۰ روز با غذای پلت شده حاوی پروبیوتیک تک سل تغذیه شدند (ساعات ۸ صبح، ۲ بعد از ظهر و ۱۰ شب) و پارامترهای دما، شوری و اکسیژن ثبت گردید. در آغاز و پایان دوره ۴۰ روزه، میگوها بیومتری و اطلاعات مربوطه ثبت شد و همچنین از میگوهایی که در فاز بین دو پوست‌اندازی بر اساس کلید شناسایی مراحل پوست‌اندازی (Promwikorn *et al.*, 2004) بودند، نمونه همولمف جمع‌آوری شد و شاخص سلامت شامل THC، DHC و TPP، اندازه‌گیری و تعیین گردید و در تیمارها با گروه‌های شاهد مثبت و منفی، مقایسه شد (Zhenguo *et al.*, 2003).

در این پژوهش ۲ گروه شاهد (مثبت و منفی) و سه تیمار و هرکدام با سه تکرار (به شرح جدول ذیل) منظور شد.

در مورد شاهد مثبت در مدت ۴۰ رور نخست با جیره غذایی فاقد پروبیوتیک تغذیه و در پایان ۴۰ روز با ویروس لکه سفید مواجهه داده شد. مواجهه در اکواریوم‌های ۱۵۵ لیتری که حاوی ۵۰ لیتر آب دریای فیلتر شده و کلر زده که از مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خلیج فارس تامین شده بود انجام گردید. به مدت ۲ هفته درصد بازماندگی در تمامی تیمارها پیگیری و ثبت شد. برای آلوده کردن میگوها از تغذیه کردن میگوهای تیمارها و شاهد مثبت با میگوهای تلف شده بر اثر بیماری لکه سفید (که پس از انجام تستPCR، در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد منجمد شده بودند) برای آلوده کردن میگوها استفاده شد.

جدول ۱: گروه‌های شاهد و تیمار، نوع تغذیه هر گروه، مواجهه یا عدم مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید میگو، نام اختصاری منظور شده برای هر گروه و تعداد میگو در هر تیمار

نام اختصاری تیمار	تعداد میگو در هر تکرار	مواجهه با عامل ویروسی	تغذیه با جیره واجد پروبیوتیک
C1	۳×۳۰	منفی	شاهد منفی (پروبیوتیک- و مواجهه -)
C2	۳×۳۰	مثبت	شاهد مثبت (پروبیوتیک- و مواجهه +)
T1	۳×۳۰	مثبت	$۱۰^{۶}$ CFU/Kg در هر گرم خوراک
T2	۳×۳۰	مثبت	$۱۰^{۷}$ CFU/Kg در هر گرم خوراک
T3	۳×۳۰	مثبت	$۱۰^{۸}$ CFU/Kg در هر گرم خوراک

برای تعیین THC ، همولمف از سینوس شکمی و از بند دوم نمونه‌برداری شد. برای این منظور از سرنگ ۱ml انسولین حاوی ۰/۴ ml آنتی کوآگولانت Alseverبا دمای ۴ درجه سانتیگراد وpH برابر با ۷/۲ استفاده گردید (Jiang *et al.*, 2004). پس از نمونه‌برداری، محتویات سرنگ به اپندروف ۲ میلی‌لیتری مخصوص سانتریفیوژ که از قبل حاوی ml ۰/۴ آنتی‌کوآگولانت بود انتقال یافت و برای هر میگو دو اسمیر از همولمف آسپیره شده، تهیه و در مجاورت هوا خشک شد. همولمف باقی‌مانده در اپندورف‌ها تا ۱ ساعت پس از نمونه‌برداری بر روی یخ قابل نگهداری است.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

برای تعیین DHC ، اسمیرهای تهیه شده از همولمف به روش Gimsa – May Grunwad رنگ‌آمیزی شدند (Ghaednia *et al*., 2011) و سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند (Kidchakan and Juadee, 2003).

برای اندازه گیری TPP از روش لوری استفاده شد. این روش بر اساس تبدیل Cu^{2+} به Cu^{+} در شرایط قلیایی و واکنش مس قلیایی با پروتئین‌ها و احیای فسفومولیبدات (معرف فولین) توسط تیروزین و تریپتوفان پروتئین‌ها استوار می باشد. در اثر ایجاد کمپلکس پروتئین‌ها با معرف فولین (ترکیبات آن عبارتند از: تنگستات سدیم و مولیبدات سدیم در اسیدفسفریک و اسید کلریدریک)رنگ آبی ایجاد می‌شود که شدت رنگ حاصله به مقدار اسید آمینه‌های

۱- پودر کردن خوراک پلت شده
۲- افزودن آب (۳/۵ درصد وزن خشک)
۳- حرارت دهی در حمام آب گرم $80\ ^{o}C$
۴- مخلوط کردن با همزن با دور بالا
۵- افزودن پروبیوتیک به میزان تعیین شده در هر تیمار
۶- مخلوط کردن با همزن با دور بالا

برای تیماربندی، در ابتدا جمعیت میگوهای جمع‌آوری شده از نظر نرمال بودن توزیع وزن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به حجم نمونه (تعداد میگوها بیش از ۵۰ عدد)، از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد برای تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه و برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد از حلقوی فوق بستگی دارد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری و با منحنی استاندارد مقایسه شده و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین گردید.

روش تهیه غذای حاوی پروبیوتیک

برای اضافه کردن پروبیوتیک به غذای پلت شده به گونه ای عمل شد که پس از اضافه کردن آن به خوراک پلت شده، خوراک در آب حل نشود، برای این منظور آگار اضافه گردید (Zhang *et al*., 2011, Chai *et a*l., 2016).

مراحل تهیه کردن جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک تک سل:

۷- افزودن آگار، ۰/۰۵ تا ۰/۱ درصد وزن خشک
۸- مخلوط کردن با همزن با دور بالا
۹- نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد
۱۰- انتقال به دمای منفی ۱۵ درجه سانتیگراد
۱۱- تبدیل به قطعات مورد نظر
۱۲- نگهداری جیره‌های‌تولید شده در دمای $4\ ^{o}C$

آزمون‌های Post Hoc دانکن، توکی و جیمز- هاول استفاده شد.

نتایج

اثر پروبیوتیک بومی بر شاخص‌های سلامتی (THC و TPP) میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

تعداد هموسیت کل میگوهای سفید غربی در ابتدای تیماربندی، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره‌های حاوی مقادیر تعیین شده پروبیوتیک تک سل در گروه شاهد منفی بین ۹/۴۵±۷۰/۶۷ و ۵/۵۷±۷۵/۰۰ تعیین گردیدکه برحذف فاکتورهای مذاخله کنند درروند آزمایش دلالت دارد (جدول ۲).

همانطور که در جدول ۳ مشـــاهد می‌شـــود، افزایش میزان پروتئین پلاســمای کل در میگوهای تیمار T3 پس از ۴۰ روز تغـذیـه بـا جیره‌هـای حـاوی CFU/Kg۱۰۸ پروبیوتیک تک ســل و همچنین ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس لکه سـفید، اختلاف معنی داری با شاهد منفی و مثبت نشان داد.

جدول۲: تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید غربی در ابتدای تیماربندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8CFU/Kg پروبیوتیک تک سل

تیمارها	تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×)		
	در ابتدای تیماربندی	پس از ۴۰ روز تغذیه	۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس
C1	۷۰/۶۷±۹/۴۵ a	۷۳/۶۷±۱۳/۰۵ a	۷۵/۰۰±۵/۵۷ b
C2	۶۹/۰۰±۶/۵۶ a	۷۲/۳۳±۱۲/۵۰ a	۳۹/۳۳±۱۴/۰۱ a
T1	۷۰/۳۳±۱۰/۰۲ a	۱۰۳/۶۷±۱۳/۵۸ b	۷۵/۳۳±۱۴/۲۹ c
T2	۷۲/۰۰±۸/۷۲ a	۱۲۶/۳۳±۶/۰۳ c	۷۳/۳۳±۱۲/۳۹ c
T3	۷۴/۶۷±۵/۸۶ a	۱۲۷/۳۳±۶/۶۶ c	۸۹/۳۳±۱۵/۵۰ d

وجود حروف a، b، c و d در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر تعیین شده در هر جدول می‌باشد.

جدول ۱: پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید غربی در ابتدای تیماربندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8CFU/Kg پروبیوتیک تک سل

تیمارها	پروتئین پلاسمای کل(mg/ml)		
	در ابتدای تیماربندی	پس از ۴۰ روز تغذیه	۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس
C1	۷۷/۱۷±۱۲/۳۶ a	۷۴/۲۲±۱۰/۹۴ a	۷۱/۹۱±۷/۶۱ b
C2	۷۲/۴۲±۱۰/۵۱ a	۷۳/۴۳±۱۹/۳۶ a	۴۸/۲۷±۶/۲۱ a
T1	۷۴/۴۲±۱۵/۷۲ a	۱۱۰/۵۹±۹/۸۰ b	۸۶/۸۲±۲۷/۳۰ c
T2	۷۸/۷۹±۱۱/۰۲ a	۱۰۷/۶۳±۱۱/۷۴ b	۱۰۵/۸۵±۱۵/۰۵ c
T3	۷۸/۱۱±۱۴/۳۶ a	۱۱۷/۴۲±۱۲/۳۴ b	۱۱۹/۹۳±۲۵/۹۵ d

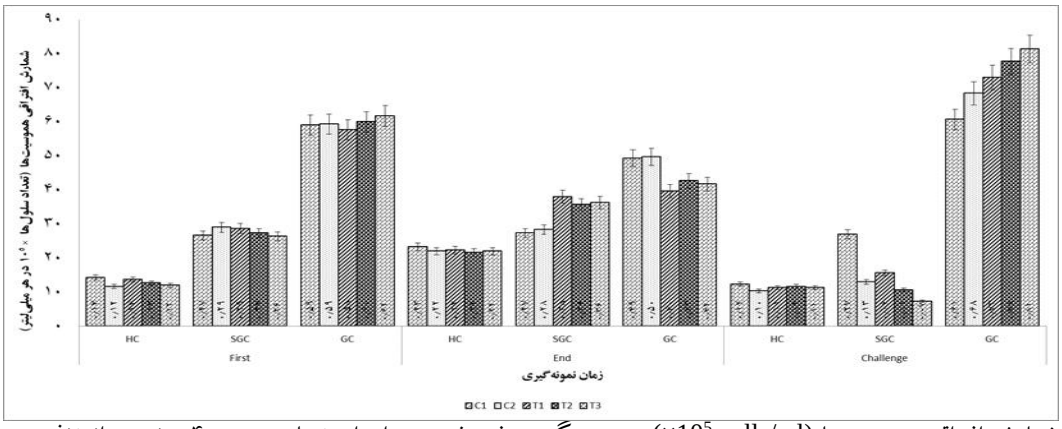
وجود حروف a، b، c و d در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر تعیین شده در هر جدول می‌باشد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

اثر پروبیوتیک بومی بر شمارش افتراقی هموسیت‌های میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

تابلوی خونی مربوط به شمارش افتراقی هموسیت‌های میگوهای این مطالعه نشان می‌دهد تغذیه با جیره‌های حاوی ۱۰۶ و ۱۰۷ و ۱۰۸CFU/Kg پروبیوتیک تک سل، نشان داد که هموسیت‌های گرانیولار که در مقابله با عوامل ویروسی نقش اصلی را ایفاء می‌کنند. افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهند (شکل ۱).



شکل ۱: شمارش افتراقی هموسیت‌ها (10^5 cells/ml×) در در میگوی سفید غربی در ابتدای تیماربندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف ۱۰۶ و ۱۰۷ و ۱۰۸CFU/Kg پروبیوتیک تک سل H: Hyaline cells, GC: Granular Cells, (SGC: Semi Granular Cells)

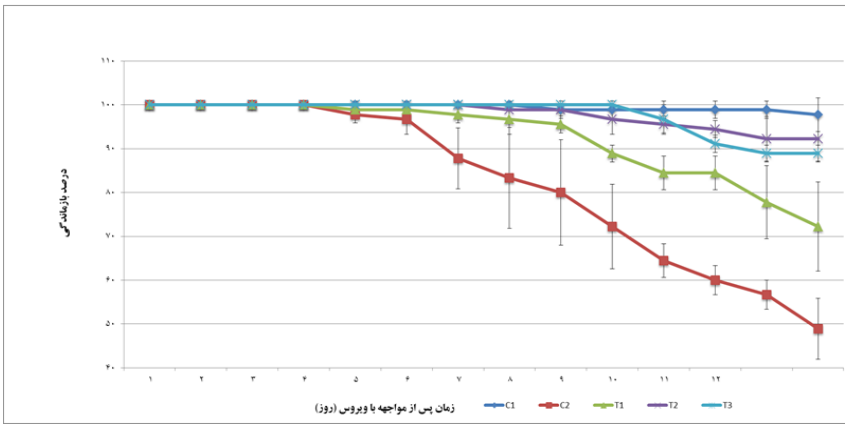
اثر پروبیوتیک بومی بر پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

به میگوهای گروه شاهد منفی و مثبت و همچنین میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سه مقدار مختلف ۱۰۶ و ۱۰۷ و ۱۰۸ CFU/Kg از پروبیوتیک تک سل به مدت ۴۰ روز، در پایان دوره تغذیه،۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ویروسی به هر میگو تزریق شد (به غیر از گروه شاهد منفی که به جای سوسپانسیون ویروسی سرم فیزیولوژی در یافت نمودند) ، در پایان دوره ۱۴ روزه پس از تزریق، میانگین بازماندگی بترتیب به ۹۶/۷±۵/۸، ۴۰±۱۰، ۶۳/۳±۵/۸، ۸۰±۱۰ و ۷۶/۷±۵/۸ درصد رسید. آنالیز واریانس یک طرفه در هفته اولِ پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی در پایان هفته دوم اختلاف معنی‌داری در بازماندگی بین گروه شاهد مثبت و منفی ($P<0.001$) مشاهده شد. در پایان هفته دوم نیز، میانگین بازماندگی در میگوهای شاهد مثبت با میگوهای تیمار T1 ($P= 0.027$)، تیمار T2 ($P=0.001$) و تیمار T3 ($P=0.003$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۴ و شکل۲).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

جدول ۲: درصد بازماندگی میگوهای سفید غربی مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سه مقدار ۱۰^۶ و ۱۰^۷ و ۱۰^۸ CFU/Kg از پروبیتیک تک سل

تیمارها	تعداد میگوها	زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)، میزان بازماندگی (درصد) و تعداد میگوهای زنده در هر تکرار										
		۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
C1	۱۰۰	۳×۳۰	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۳۰)	۹۷/۷۸±۳/۸۵ (۳۰، ۲۸ و ۳۰)
C2	۱۰۰	۳×۳۰	۹۷/۷۸±۱/۹۲ (۲۹، ۳۰ و ۲۹)	۹۶/۶۷±۳/۳۳ (۲۸، ۳۰ و ۲۹)	۸۷/۷۸±۶/۹۴ (۲۸، ۲۷ و ۲۴)	۸۳/۳۳±۱۱/۵۵ (۲۷، ۲۷ و ۲۱)	۸۰/۰۰±۱۲/۰۲ (۲۷، ۲۵ و ۲۰)	۷۲/۲۲±۹/۶۲ (۲۵، ۲۰ و ۲۰)	۶۴/۴۴±۳/۸۵ (۲۰، ۲۰ و ۱۸)	۶۰/۰۰±۳/۳۳ (۱۸، ۱۹ و ۱۷)	۵۶/۶۷±۳/۳۳ (۱۷، ۱۸ و ۱۶)	۴۸/۸۹±۶/۹۴ (۱۳، ۱۷ و ۱۴)
T1	۱۰۰	۳×۳۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۳۰ و ۲۹)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰، ۳۰ و ۲۹)	۹۷/۷۸±۱/۹۲ (۳۰، ۲۹ و ۲۹)	۹۶/۶۷±۳/۳۳ (۳۰، ۲۹ و ۲۸)	۹۵/۵۶±۱/۹۲ (۲۹، ۲۹ و ۲۸)	۸۸/۸۹±۱/۹۲ (۲۷، ۲۶ و ۲۷)	۸۴/۴۴±۳/۸۵ (۲۶، ۲۴ و ۲۶)	۸۴/۴۴±۳/۸۵ (۲۶، ۲۴ و ۲۶)	۷۷/۷۸±۸/۳۹ (۲۱، ۲۳ و ۲۶)	۷۲/۲۲±۱۰/۱۸ (۲۱، ۱۹ و ۲۵)
T2	۱۰۰	۳×۳۰	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۲۹، ۳۰ و ۳۰)	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۲۸، ۲۹ و ۳۰)	۹۶/۶۷±۳/۳۳ (۲۸، ۲۹ و ۳۰)	۹۵/۵۶±۱/۹۲ (۲۸، ۲۹ و ۲۹)	۹۴/۴۴±۱/۹۲ (۲۸، ۲۸ و ۲۹)	۹۲/۲۲±۵/۰۹ (۲۶، ۲۸ و ۲۹)	۹۲/۲۲±۵/۰۹ (۲۶، ۲۸ و ۲۹)
T3	۱۰۰	۳×۳۰	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۱۰۰ (۳۰، ۳۰ و ۳۰)	۹۶/۶۷±۳/۳۳ (۲۸، ۳۰ و ۲۹)	۹۱/۱۱±۱/۹۲ (۲۷، ۲۸ و ۲۷)	۸۸/۸۹±۱/۹۲ (۲۷، ۲۶ و ۲۷)	۸۸/۸۹±۱/۹۲ (۲۷، ۲۶ و ۲۷)



شکل ۲: درصد بازماندگی میگوهای سفید غربی مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سه مقدار ۱۰^۶ و ۱۰^۷ و ۱۰^۸ CFU/Kg از پروبیتیک تک سل

بحث

میگوها مانند سایر بی‌مهرگان، به منظور دفاع و مقابله دربرابر یک عفونت، کاملاً به سیستم ایمنی غیراختصاصی خود وابسته هستند و فاقد حافظه ایمنولوژیک شناخته شده در مهره‌داران می‌باشند (Bachère, 2000). بکارگیری پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به منظور کنترل باکتری‌های بیماری‌زا، بهبود شاخص‌های رشد، تعدیل سیستم ایمنی و آنزیم‌های گوارشی میزبان گزارش شده است (Chai *et al.*, 2016). در میان گونه‌های پروبیوتیک باکتریایی، خانواده باسیلاسه به طور گسترده‌ای در تکثیر و پرورش میگو استفاده می‌شود.

در این پژوهش پروبیوتیک بومی "تک‌سل" که بر اساس مطالعات ۸ ساله موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در پژوهشکده میگوی کشور و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است، در جیره غذایی میگوهای پرورشی سفید غربی با میانگین وزنی بیش از ۶ گرم افزوده شد (به سه مقدار مختلف ۱۰^۶ (T1) و ۱۰^۷ (T2) و ۱۰^۸ (T3) CFU/Kg) و شاخص‌های سلامتی، شامل THC، TPP و DHC میگوها در ابتدای تیماربندی، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره‌های اشاره شده و ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس لکه سفید، تعیین گردید.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

با توجه به نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های سلامتی و درصد بازماندگی میگوهای شاهد منفی (C1) در ابتدای تیماربندی و پایان دوره تغذیه با جیره‌های حاوی پروبیوتیک، مشاهده نشد ($P\geq ۰/۰۵$). در گروه شاهد مثبت (C2) که بدون دریافت پروبیوتیک، صرفاً با ویروس لکه سفید مواجهه داشت، پس از مواجهه با ویروس، کاهش معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) در شاخص‌های سلامتی، THC و TPP مشاهد گردید. درصد بازماندگی آنها، ۱۰±۴۰ تعیین شد که نشان از استرس و مرگ و میر شدید در این گروه است و تأییدی بر فعال بودن ویروس و تلفات ناشی از مواجهه با آن می‌باشد.

نکته بسیار مهم کاهش معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) و شدید THC در میگوهای C2، دو هفته پس از مواجهه با ویروس لکه سفید است (جدول۲). با بررسی دقیق تابلوی خونی (DHC)، مشخص می‌شود که تعداد هموسیت‌های هیالین (Semi Granular Cells, SGC)، ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس کاهش پیدا کرده و جاندار با افزایش هموسیت‌های نیمه گرانولار (Granular Cells, GC) ، تلاش کرده تا پاسخ سازگاری مناسبی به استرس مواجهه با ویروس لکه سفید بدهد (شکل ۱). با توجه به نقش GC در فعالیت‌های سایتوتوکسیسیتی مهار عفونت‌های ویروسی، این واکنش، منطقی به نظر رسیده و این امر کاهش شدید هموسیت‌های SGC را توجیه می‌کند. این یافته با نتایج و یافته‌های عبداللهی آرپناهی و همکاران (۱۳۹۳) مطابقت دارد.

نکته‌ای که باید در تفسیر نتایج DHC با دقت مورد توجه قرار گیرد، افزایش نسبت هموسیت‌های SGC نسبت به GC ها در پایان دوره تغذیه با جیره‌های حاوی پروبیوتیک در تیمارهای T1، T2 و T3 است. با توجه به مواجهه میگوها با پروبیوتیک باکتریایی "تک‌سل"، تغییر در تابلوی خونی و افزایش نسبی هموسیت‌های هیالین (Hyaline Cells, H) و SGC موجب کاهش نسبی هموسیت‌های GC شده است که این موضوع در پایان دوره ۱۴ روزه پس از مواجهه با ویروس تغییر کرده و تعداد هموسیت‌های H در تمام تیمارها، کاهش یافته و به درصد سلول‌های شاهد می‌رسد (شکل ۱) و با توجه به نقش حیاتی هموسیت‌های GC در مقابله با عوامل ویروسی، تعداد این سلول‌ها افزایش می یابد. مهمترین نقش ایمونولوژیک هموسیت‌های H، فاگوسیتوز می‌باشد و لی هموسیت‌های SGC در تشکیل ندول و کپسول نقش اصلی را ایفا می کنند (Bachère, 2000). این یافته‌ها با نتایج Gullian و همکاران (۲۰۰۴) هم‌خوانی دارد.

در تیمارهای T1، T2 و T3 که به ترتیب جیره‌های غذایی حاوی $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ CFU/Kg را دریافت کرده‌اند پس از تغذیه با این جیره‌ها به مدت ۴۰ روز دارای شاخص سلامتی بهتری در مقایسه با شاهد بوده و در خصوص THC مشاهد گردید که در پایان دوره تغذیه، در هر سه تیمار افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) را با شاهد نشان می‌دهند و در بین تیمار T1 با دو تیمار T2 و T3 نیز اختلاف معنی‌داری مشاهد شده و میزان THC در دو تیمار T2 و T3 بیشتر است. پس از گذشت ۱۴ روز از مواجهه با ویروس، میزان THC در تیمار C2 به شدت کاهش یافته و تیمارهای T1 و T2 نیز اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نمی‌دهند ($P\geq 0.05$) ولی این میزان THC در تیمار T3 افزایش داشته و اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان داد ($P\leq ۰/۰۵$). همانطور که از نمودار DHC استنباط

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

می‌شود، جانور برای مقابله با عفونت ویروسی، تعداد هموسیت‌های GC را افزایش داده است به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری بین تعداد هموسیت‌های GC در تیمارهای T2 و T3 با تیمار T1 و شاهدهای مثبت و منفی دیده می‌شود (P≤۰/۰۵). کاهش شدید هموسیت‌های SGC نشان از افزایش قدرت سازگاری میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک در مقابسه با C1 و C2 در مقابله با عفونت ویروسی دارد (Supamattaya *et al*., 2003). این یافته‌ها با نتایج Andrade محققین دیگر مطابقت نشان می‌دهد (Andrade, 2011, Zuo *et al*., 2019, Amoah *et al*., 2019).

همانطور که در خصوص نقش فعالیت هموسیتی در مواجهه و مقابله سیستم ایمنی میگو با عفونت‌های ویروسی بیان شد، در مطالعه TPP نیز مشاهد می‌شود که علی‌رغم کاهش شدید شاخص‌های THC و TPP در میگوهای C2 پس از گذشت ۱۴ روز از مواجهه با ویروس، اختلاف معنی‌داری بین شاخص TPP در میگوهای T1 و T2 مشاهده نمی‌شود و می‌توان این موضوع را به تحریک سیستم ایمنی میگوهای تیمارهای T1، T2 و T3 دانست. افزون بر این تیمار T3 اختلاف معنی‌داری را با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. یافته‌های مشابه پژوهش انجام شده توسط Liu و همکاران (۲۰۱۰b) نیز بر نقش پروتئین کل پلاسما در این خصوص تأکید کرده و با یافته‌های پژوهش جاری مطابقت نشان می‌دهد.

تعیین درصد بازماندگی در پایان دوره ۱۴ روزه پس از مواجهه با ویروس، اطلاعات به دست آمده از شاخص‌های سلامتی را تایید کرده و کمترین درصد بازماندگی (۶/۹۴±۴۸/۸۹)، در شاهد C2 مشاهده شد (شکل **۲** و جدول ۲). نکته مهم، بیشتر بودن درصد بازماندگی در تیمار T2 نسبت به تیمار T3 است. تمامی محرک‌های سیستم ایمنی حکم شمشیر دو لبه را داشته و در معرفی یک محرک سیستم ایمنی باید دقت نمود که محرک سیستم ایمنی مناسب، ترکیبی است که سیستم ایمنی جانور را به آرامی و به مقدار لازم تحریک نماید. تحریک بیش از حد سیستم ایمنی، موجب می‌گردد که بخشی از انرژی و توان فیزیولوژیک جانور، که باید منجر به تولید نهایی گردد، صرف افزایش سطح و عملکردایمنی جانور شود.

بر اساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان بیان کرد که تغذیه میگوهای سفید غربی با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ CFU/Kg بر بهبود عملکرد سیستم ایمنی میگوها و تابلوی خونی آنها اثر مثبت داشته و موجب بهبود شاخص‌های سلامتی، تعدادهموسیت کل و میزان کل پروتئین پلاسما، می‌گردد. افزون بر این تغذیه با جیره‌های غذایی مورد اشاره، در افزایش درصد بازماندگی میگوهای مواجهه یافته با ویروس لکه سف ید، موثر می‌باشد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه همکاران پژوهشکده میگوی کشور و موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. حسن نیا، م. ر.، احمدی .م. ر.، رضویلر .و.، ۱۳۸۱. بررسی اثر باکتری *Pseudomonas fluorescence*

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

بر بازماندگی لاروهای میگوی سفید هندی، پژوهش و سازندگی، ۱۵، ۹۴ – ۹۸.

۲. خانجانی، م. ح.، سجادی، م. م.، علیزاده؛ م.، سوری نژاد، ا.، ۱۳۹۵. تولید و ارزیابی بیوفلوک به‌منظور به کارگیری در سیستم پرورشی بدون تعویض آب. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰ (۱)،۳۳-۴۲.

۳. عبداللهی آرپناهی، د.، جعفریان، ح.ا.، سلطانی، م.، قلی ک.پ.ح.س.، ۱۳۹۳. بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک‌های باسیلوسی بر پاسخ های ایمنی و فلور میکروبی روده پست لارو میگوی پا سفید غربی *Litopenaeus vannamei* . مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۴)، ۱۰۵-۱۱۷.

۴. وشتانی، س.، عابدیان کناری، ع.ح.، اکرمی، ر.، جیران، آ.، ۱۳۹۳. اثر جیره‌های حاوی سین بیوتیک (ترکیب پرو بیوتیک پروتکسین و پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید) بر عملکرد رشد، بقاء و ترکیب لاشه میگوی جوان پاسفید غربی، نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۸ (۱)،۱-۱۷.

5. Amoah, K., Huang, Q.C., Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, Q.H., Liu, H.Y., Dong, X.H., 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Fish and Shellfish Immunology, 87, 796- 808.
6. Andrade, A.J., Nauwynck, H., and Sorgeloos P., 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Master's dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Aquaculture. 72p.
7. Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture, 191, 3- 11.
8. Chai, P.C., Song, X.L., Chen, G.F., Xu, H., Huang, J., 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus, Fish and Shellfish Immunology, 54, 602- 11.
9. Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian Journal of Experimental Biology, 39, 939–942.
10. Ghaednia, B., Mehrabi, M.R., Mirbakhsh, M., Yeganeh, V., Hoseinkhezri, P., Garibi, G., Ghaffar Jabbari, A., 2011. Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(4), 616-630.
11. Gullian, M., Thompsonb, F., Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233, 1 – 14.
12. Jiravanichpasial, P., Chuaychuwong, P., Menasveta, P., 1997. The use of *Lactobacillus sp.* as the probiotic bacteria in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Poster session of the 2nd Asia-Pacific marine biotechnology conference and 3rd Asia-pacific conference on algal biotechnology. pp. 7-10, Phuket Thailand. P16.
13. Kidchakan, S., and Juadee, P., 2003. Morphology and immunological roles of hemocytes and fixed phagocytes in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Fish Pathology, 38(2), 33-39.
14. 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 Letter, 29, 525–530.
15. Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L., Wang, S.W. 2010a. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus*

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]

vannamei, by a protease-producing probiotic, Bacillus subtilis E20, from natto. Journal of Applied Microbiology, 107(3), 1031-41.
16. Liu., K.F., Chiu., C.H., Shiu., Y.L., Cheng., W., Liu., C.H., 2010b. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish and Shellfish Immunology, 28(5-6), 837-44.
17. Mirbakhsh, M., Akhavansepahy, A., Afsharnasab, M., Khanafari, A., Razavi. M.R., 2013. Screening and evaluation of indigenous bacteria as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae. Iranian Journal of Fisheries Science, 12(4), 873-886.
18. Newman, S.G., 2013. A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. Biotechnology benefiting aquaculture, pp. 28-30.
19. Quang, N.D., Hoa, P.T.P, Da, T.T., Anh, P.H., 2008. Persistence of White Spot Syndrome Virus in Shrimp Ponds and Surrounding Areas after an Outbreak. Environmental Monitoring and Assessment, 156(1-4) 69-72.
20. Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191,271–288.
21. Salehi, H., 2010. The economic impacts of WSSV on shrimp farming production and export in Iran. Aquaculture Animal Health, 14(2), 29-31.
22. Supamattaya, K., Itami, J.T., Phromkunthong, K.C.W., Muroga, K., 2003. Morphology and Immunological Roles of Hemocytes and Fixed Phagocytes in Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathology, 32(2), 33-39.
23. Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z., 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis and B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Research, 42, 943-952.
24. Zhenguo, Q., Ruiying, T., Ningyu. H., 1994. Three strains photosynthetic bacteria applied for Prawn diet and their cultural effect. Marine Science, 2, pp. 4-7.
25. Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 33(4), 683-689.
26. Zuo, Z.H., Shang, B.J., Shao, Y.C., Li, W.Y., Sun, J.S., 2019. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 86, 160-168.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.3.7.9]