اثر استفاده از ناپلی آرتمیای غنی شده با دو پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* و *Bacillus subtilis* در پست لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) روی شاخص‌های ایمنی و مقاومت در برابر چالش‌های استرس‌زای محیطی

تیرداد مقصودلو[1]، عبدالرحیم پذیرا[1]، اسماعیل عاشوری نژاد تاسنده[1]، طاهره باقری[2]
[1]Email: tirdad.m51@gmail.com
1: گروه شیلات، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران
2: موسسه تحقیقات شیلات ایران، مرکز تحقیقات آب های دور چابهار،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

چکیده: پژوهش حاضر به منظور ارزیابی پروبیوتیک‌های *Pediococcus pentosaceus* و *Bacillus subtilis* بصورت انفرادی و تلفیقی، بر فاکتورهای، بازماندگی، پاسخ ایمنی و مقاومت به تنش‌های محیطی در پست لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) طی یک دوره‌ی 16 روزه انجام شد. لارو میگو با آرتمیای فرانسیسکانای غنی‌سازی شده با غلظت 10^7 واحد کلنی در گرم تغذیه شد. تیمارها عبارت بودند از: تیمار تغذیه با آرتمیای غنی سازی نشده به عنوان شاهد (C)، تیمار غنی سازی شده با پدیوکوکوس(P)، تیمار غنی سازی شده با باسیلوس (B) و تیمار غنی سازی شده با تلفیقی از دو پروبیوتیک (BP). نتایج نشان داد که کاربرد پروبیوتیک‌های مورد استفاده از طریق غنی‌سازی آرتمیا باعث بهبود معنی‌دار شاخص‌های بقا، کورتیزول، مقاومت به تنش فرمالین و مقاومت به تنش شوری گردید ($P<0/05$) . نتایج بررسی میزان آنزیم لیزوزیم و پروتئین کل حاکی از عدم تاثیرگذاری تیمارهای پروبیوتیکی بود. در مجموع تیمار تلفیقی (BP) بیشترین تاثیر را داشت. به طورکلی می‌توان بیان نمود که پروبیوتیک‌های مورد استفاده شده قادر به کاهش کورتیزول، افزایش بقا و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی بوده‌اند ولی از نظر شاخص‌های پروتئین کل و لیزوزیم با وجود ایجاد روند افزایشی، نیاز به مدت زمان بیشتری برای اثرگذاری مثبت دارند. همچنین همچنین استفاده همزمان از پروبیوتیکها اثر سینرژیسم بر سلامتی لارو میگو دارد.

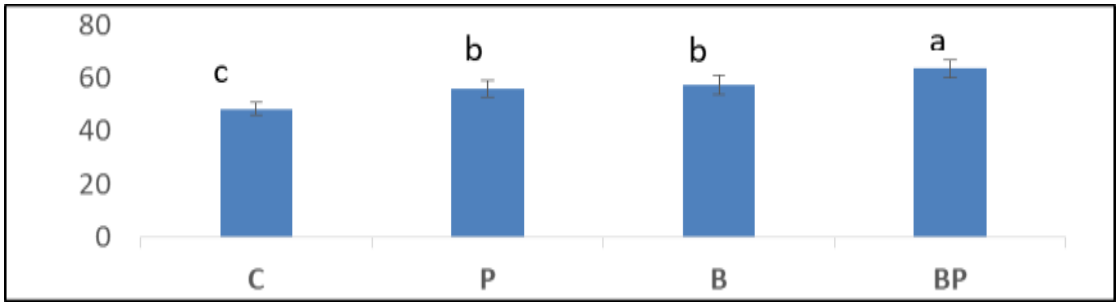
کلمات کلیدی: پروبیوتیک؛ میگوی پاسفید غربی؛ بازماندگی؛ ایمنی

مقدمه: در سال‌های اخیر با توجه به رشد روزافزون آبزی‌پروری، یکی از مهمترین عوامل محدودکننده‌ی این صنعت بروز بیماری‌ها و عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا بوده است (پرس سانچز و همکاران، 2014). به منظور پیشگیری از بروز بیماری، اغلب آبزیان پرورشی را با هدف ایجاد مصونیت در برابر بیماری‌های باکتریایی، مورد واکسیناسیون یا شیمی درمانی قرار می‌دهند و یا آنتی بیوتیک ها را تجویز می کنند که هیچ کدام از این روش‌ها به طور کامل در درمان بیماری یا جلوگیری از بروز و شیوع عامل بیماریزا موثر نمی‌باشند(آندرسون، 1992؛ بالتازار و همکاران، 2006). از جمله روش‌های کنترل بیماری‌ها در آبزی پروری، تقویت مکانیسم‌های دفاعی با اجرای اقدامات پیشگیرانه و تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی است (جی و همکاران، 2009). یکی از روشهای پذیرفته شده در افزایش ایمنی وکیفیت تولید در آبزی پروری، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشند (داس و همکاران، 2017). با توجه به اینکه یکی از روش های استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزیان استفاده از حاملهایی مانند آرتمیا می باشد و تغذیه پست لارو میگو با غذای زنده برای بالا بردن کیفیت آن ضروری است (ژو و همکاران، 2009)، آزمایشی با استفاده از آرتمیای غنی شده با پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* و *Bacillus subtilis* بر روی پست لارو میگوی وانامی انجام گردید.

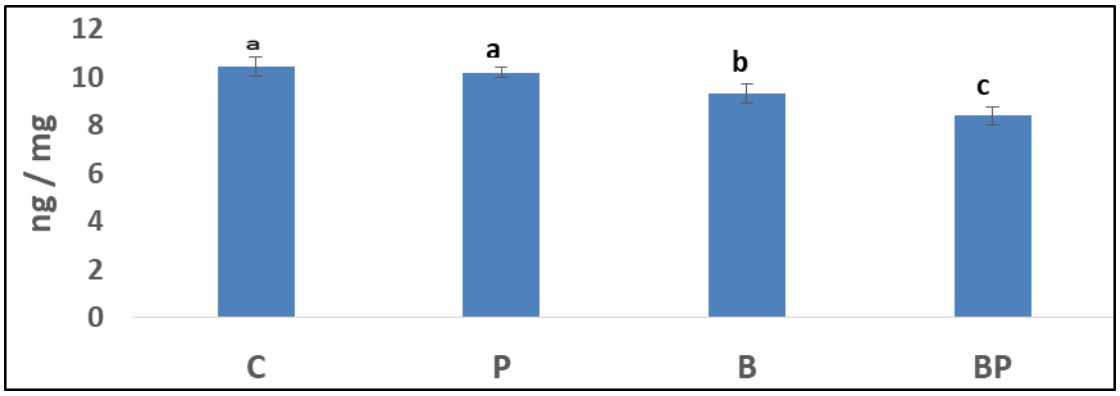
مواد و روش کار: این تحقیق در مرکز تکثیر میگوی گلستان لارو واقع در استان بوشهر از مرحله‌ی سوم مایسیس (M_3) تا پست لارو 15 (PL_{15}) در خرداد 1395 انجام گردید. بدین منظور از 12 مخزن 50 لیتری با حجم آب 40 لیتر استفاده گردید. چهار تیمار آزمایشی طراحی شد که عبارتند از: تیمار C: بدون غنی سازی؛ تیمار P: غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceu*؛ تیمار B: غنی‌سازی آرتمیا با پروبیوتیک *Baillus subtilis* ؛ تیمار BP: پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Pediococcus pentosaceus* به صورت تلفیقی و با نسبت 1:1 برای غنی‌سازی آرتمیا استفاده شد و بعد آرتمیای غنی شده مورد مصرف لاروها قرار گرفت. غذادهی در طول دوره ی تحقیق به صورت 4 بار در روز در ساعت‌های 6، 12، 18 و 12 بامداد صورت

می‌گرفت. پس از رسیدن پست لاروها به مرحله‌ی 15، لارو موجود در هر مخزن به صورت جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و به آزمایشگاه پژوهشکده خلیج فارس منتقل گشت و تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف در پست لاروها مورد سنجش قرار گرفت. این فاکتورها عبارت بودند از: کورتیزول با روش رادیوایمونواسی (RIA)؛ اندازه‌گیری لیزوزیم با روش کدورت سنجی؛ اندازه‌گیری پروتئین تام با روش نفلومتری انجام گرفت. از شوری 10ppt برای ایجاد تنش شوری و سنجش مقاومت لاروها استفاده شد و تعداد لاروهای تلف شده در زمان 120 دقیقه ثبت شد. برای ایجاد تنش فرمالین به حجم یک لیتر از آب 200 میلی گرم در لیتر فرمالین اضافه شد و عمل هوادهی نیز صورت نگرفت و پس از 60 دقیقه میزان مرگ و میر آنها محاسبه و ثبت شد. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها پس از نرمال‌سازی از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و از آزمون آماری دانکن برای بیان معنی‌دار بودن و یا نبودن اختلاف میانگین تیمارها با یکدیگر استفاده شد.

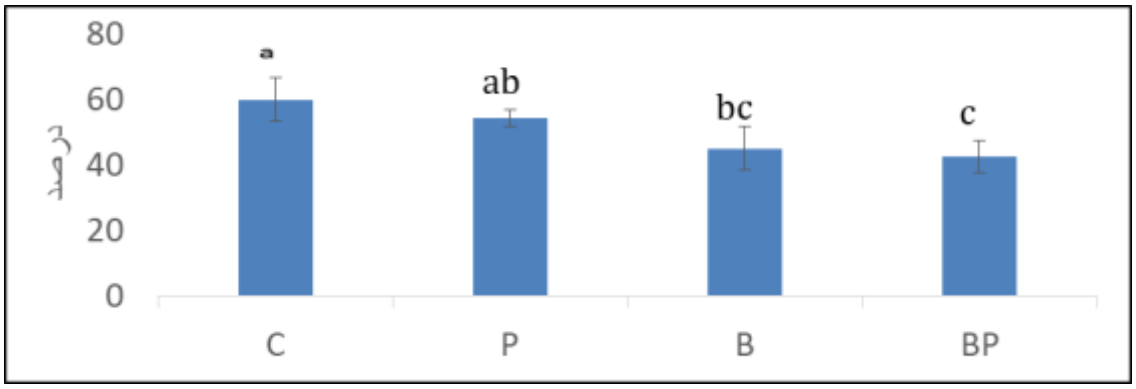
نتایج و بحث: نمودار 1 درصد بازماندگی کل در پایان دوره آزمایشی را در بین تیمارهای چهار گانه نشان می‌دهد. چنانکه مشاهده میگردد میزان درصد بازماندگی در تیمار تلفیقی (BP) نسبت به سه تیمار باسیلوس(B) ، پدیوکوکوس (P) و تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<0/05). تیمارهای باسیلوس(B) و پدیوکوکوس (P) اگرچه نسبت به تیمار تلفیقی اختلاف معنی‌داری داشتند ولی نسبت به تیمار کنترل نیز افزایش معنی‌داری نشان دادند. میزان اندازه‌گیری شده کورتیزول همولنف در آخر دوره آزمایشی مربوط به تیمارهای مختلف در نمودار 2 نشان داده شده است. طبق این نمودار میزان کورتیزول همولنف تیمار تلفیقی (BP) نسبت به سه تیمار دیگر کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0/05). در تیمار باسیلوس اگرچه نسبت به تیمار تلفیقی افزایش معنی‌داری دیده شد ولی نسبت به دو تیمار پدیوکوکوس و کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده گردید. جدول 1 میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم را در تیمارهای چهارگانه نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می کنید میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در هیچ یک از چهار تیمار مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هر چند بیشترین میزان در تیمار باسیلوس (B) اندازه‌گیری گردید. به طور کلی بیشترین میزان لیزوزیم به ترتیب در تیمارهای باسیلوس (B)، تلفیقی (BP)، پدیوکوکوس (P) و شاهد (C) اندازه‌گیری شد. بر طبق جدول 2 میزان پروتئین تام همولنف در هیچ یک از تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. هرچند بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار تلفیقی (BP) اندازه‌گیری گردید. به طور کلی به ترتیب بیشترین میزان این پارامتر در تیمارهای تلفیقی (BP)، باسیلوس (B)، پدیوکوکوس (P) و شاهد (C) مشاهده گردید. **چالش فرمالین یکی از آزمایشهای تنش محیطی بود که** نمودار 3 میزان تلفات پست لاروهای میگوی وانامی را طی چالش 60 دقیقه‌ای با فرمالین 200 پی پی ام نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌گردد میزان تلفات در تیمار تلفیقی (BP) نسبت به تیمارهای پدیوکوکوس و شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P<0/05)، هرچند نسبت به تیمار باسیلوس این اختلاف معنی‌دار نبود. در این آزمایش بیشترین تلفات در تیمار کنترل اندازه‌گیری شد. چالش محیطی دیگر **شوری بود که طبق نمودار4** میزان تلفات پست لاروهای میگوی وانامی پس از مواجهه 120 دقیقه ای با شوری 10ppt در تیمارهای باسیلوس (B) و تلفیقی (BP) نسبت به تیمار کنترل (C) کاهش معنی‌داری داشته است. تیمار پدیوکوکوس (P) هرچند به لحاظ میزان تلفات از دو تیمار باسیلوس و تلفیقی بیشتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.



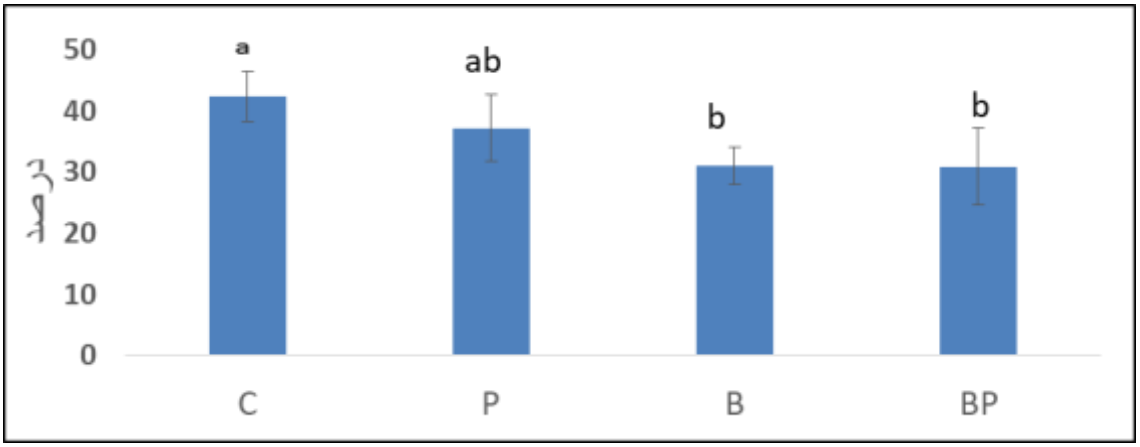
نمودار1- میزان درصد بازماندگی پست لارو میگوی وانامی



نمودار2 – میزان کورتیزول همولنف پست لارو میگوی وانامی



نمودار3 – میزان تلفات پست لارو میگوی وانامی در مواجهه با چالش فرمالین



نمودار 4– میزان تلفات پست لارو میگوی وانامی در مواجهه با چالش شوری

جدول 1– میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم همولنف پست لارو میگوی وانامی بر حسب (u/mg/min) در تیمارهای مورد مطالعه

(BP)	(B)	(P)	(C)
11/66[a]	12/33[a]	11/00[a]	10/66[a]

حروف غیرهمنام در یک ردیف دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند (P<0.05)

جدول 2 میزان پروتئین تام همولنف پست لارو میگوی وانامی بر حسب (mg/g) در تیمارهای مورد مطالعه

(BP)	(B)	(P)	(C)
54/33[a]	53/00[a]	52/33[a]	50/66[a]

حروف غیرهمنام در یک ردیف دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند (P<0.05)

نتایج این تحقیق نشان داد که تغذیه لارو میگوی وانامی با آرتمیای غنی شده با پروبیوتیک پدیوکوکوس و باسیلوس باعث تحریک سیستم ایمنی و افزایش کیفیت لارو می گردد که خود باعث کاهش تلفات در استخرهای پرورشی می شود. آرتمیا ناقل مناسبی برای انتقال پروبیوتیک به لارو میگو است. با توجه به اثر مثبت استفاده همزمان پروبیوتیکها می توان ادعا نمود که استفاده تلفیقی باعث تشدید اثرات مفید پروبیوتیکها در لوله گوارش پست لاروهای میگو شده و مشاهده روند تغییرات در شاخص‌های بقاء، سطوح شاخص‌های ایمنی و نرخ تلفات در تنش‌های محیطی تاییدی بر این ادعاست. بنابراین با توجه به حساسیت‌های موجود در صنعت تکثیر لارو میگوی کشور نظیر شیوع بیماری‌ها، تلفات بالا و خسارات اقتصادی ناشی از آن، استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی در کارگاه های تکثیر پیشنهاد می گردد.

فهرست منابع:

Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, *2*, pp.281-307.Anchez, T, P, Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., Balc azar, J. L., 2013. Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture , 5, 1–14.Balca ´zar, J.L., Blas, I. d., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Mu ´zquiz., J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture (Review), Veterinary Microbiology, 114 , 173–186.Das,S., Mondal, K., Haque, S. 2017.A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5(2): 422-429.

Ji,P.F., Yao, C.L., Wang, Z.Y., 2009. Immune response and gene expression in shrimp (Litopenaeus vannamei) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns, Fish & Shellfish Immunology, 27, 563–570.

Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L. and Wang, S.W., 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, Litopenaeus vannamei, by a protease-producing probiotic, Bacillus subtilis E20, from natto. *Journal of applied microbiology*, *107*(3), pp.1031-1041.

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

Effects of two probiotic species (*pediococcus pentosaceus* and *Bacillus subtilis*) after enriched through Artmia naupli on immunity and stress resistance of western white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae

Esmaeil Ashouri Nezhad Tasandeh[1], Tirdad Maghsoudlou[1]*, Abdolrahim Pazira[1], Tahereh Bagheri[2]
[1*]Email: tirdad.m51@gmail.com
1: Fisheries department,Bushehr branch,Islamic Azad University,Bushehr,Iran.
2: off shore Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran.

Abstract: Regarding to the challenge of diseases and consequenses mass mortality problems derived from intensive aquaculture, the use of probiotics could be helpful. This study was conducted in Golestan larvae hatchery to evaluate the effect of feeding Western white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae with Artemia naupli enriched with two bacterial probiotic (*Pediococcus pentosaceus* and *Bacillus subtilis*) individually and together,for a period of 16 days, on survival, immune responses and resistance to environmental stress. Three treatments designed with Artemia naupli enriched with *Pediococcus pentosaceus* (P), *Bacillus subtilis* (B), and combination of two probiotics (BP). One group fed with unriched naupli considered as control (C). Enriching Artemia franciscana done at a concentration of 10^7 colonies per unit (CFU). The results showed that enrichment Artemia with probiotic significantly improved survival indices, cortisol, formalin stress resistance and resistance to salinity stress. How ever, lysozyme level and total protein did not influenced by probiotic which could be related to the short duration of the study and no enough time to be influenced by probiotics.

Key words: shrimp; probiotic; immunity; survival.