فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۹- ۳۰

مقایسه تاثیر پروبیوتیک‌های *Pediococcus acidilactici* و *Lactococcus lactis* بر نرخ بازماندگی و برخی فاکتورهای ایمنی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

سارا احمدی*[۱]، مهدی سلطانی[۲]، مهدی شمسایی[۳]، هومن رجبی اسلامی[٤]، رحیم پیغان[۵]

۱، ۳، ٤- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران،

۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۵- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

دریافت: ۹٤/۰۹/۱۵ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۹

* نویسنده مسئول مقاله : sara_ahmadi_61@yahoo.com

چکیده

تأثیر پروبیوتیک‌های *Pediococcus acidilactici* و *Lactococcus lactis* بر نرخ بازماندگی و برخی فاکتورهای ایمنی میگوی وانامی (*L. vannamei*) در یک دوره‌ی پرورش ۳ ماهه ارزیابی گردید. تیمارها شامل تیمار شاهد، تیمار پدیوکوکوس و تیمار لاکتوکوکوس بود که پروبیوتیک‌ها در تیمارهای پروبیوتیکی، با دوز ۱۰ به توان ۹ در جیره غذایی استفاده شد. . نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش نرخ بازماندگی گردید که بیشترین میزان در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن لاکتوکوکوس بود ($P\leq$۰/۰۵). بهترین عملکرد ایمنی در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک‌ها مشاهده شد، فعالیت فنول‌اکسیداز، میزان پرتئین تام و گلوبولین همولنف در تیمارهای پروبیوتیکی دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد بودند ($P\leq$۰/۰۵)، در حالی‌که دارای تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر فعالیت لیزوزیم نداشت ($P\geq$۰/۰۵). در مجموع پروبیوتیک پدیوکوکوس بهترین عملکرد را در افزایش پاسخ های ایمنی و نرخ بازماندگی میگو نشان داد.

کلید واژگان: *Pediococcus acidilactici* ، *Lactococcus lactis* ، نرخ بازماندگی، فاکتورهای ایمنی، میگوی وانامی

مقدمه

تولید جهانی میگوی پرورشی، باوجود مشکلاتی مانند بروز بیماری‌های مختلف و نوسانات قیمت جهانی طی سال‌های اخیر، روندی صعودی داشته و با توجه به گزارش فائو از حدود ۸۵۰ هزار تن در سال ۱۹۹۵، به بیش از ٤/۱ میلیون تن در سال ۲۰۱۳ رسیده است. تا سال ۲۰۰۰ سه گونه عمده پرورشی شامل گونه‌های میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*)، میگوی چینی (*Fenneropenaeus*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

chinensis) و میگـوی وانـامی (*L. vannamei*)، پیشـتاز گونه‌های پرورشی بودند که ۷۸ درصد گونه‌های پرورشـی دنیا را شامل می‌شدند. از سـال ۲۰۰۰ گونـه‌هـای میگـوی پرورشی تغییـر یافـت و بـا رویکـردی نـو، گونـه وانـامی جایگزین دو گونه نـامبرده شـد. طبـق آمـار فـائو (۲۰۱۳) پرورش گونه وانامی در سال ۲۰۱۳ با بیش از ۳/۳ میلیـون تن پس از گونه‌های کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*)، کپور نقـره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، کپـور معمـولی (*Cyprinus carpio*)، صـدف مانیـل (*Ruditapes philippinarum*) و تیلاپیـای نیـل (*Oreochromis niloticus*) بـه رتبـه ششـم گونـه‌هـای پرورشی جهان رسیده است.

پرورش میگو یک سرمایه‌گـذاری سـودآور اسـت، امـا پتانسیل اقتصادی آن توسط مسائل و ملاحظات متعددی به چالش کشیده شده که به‌طور قابـل تـوجهی مـانع رشـد و توسعه پایدار شـده اسـت (Lazado *et al.,* 2015). معمـولاً بیماری‌هـای باکتریـایی و ویروسـی از مهـم‌تـرین عوامـل محدودکننده پرورش موفق میگو هستند. در گذشته استفاده از آنتی‌بیوتیک، راهبردی مرسوم برای جلـوگیری و کنتـرل شیوع بیماری بود که این عمل به‌صـورت بـی‌رویـه انجـام مـی‌شـد و بـا وجـود اسـتانداردهای پیشـگیرانه در برخـی کشـورها همچنـان ادامـه دارد (Mohapatra et al., 2013). یکی از بزرگ‌ترین نگرانی‌ها، افـزایش مقاومـت دارویـی و مقاومت در برابـر آنتـی‌بیوتیـک‌هـای مختلـف (MAR) در باکتری‌ها بود که منجر به انتقال مقاومت و کاهش اثربخشی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مـی‌شـد. عـلاوه بـر ایـن، حضـور بقایای آنتی‌بیوتیکی در حوضچه‌های پرورشـی یـک خطـر جدی زیست‌محیطی محسوب می‌شد. به‌دنبـال تـداوم ایـن نگرانی‌ها، استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌هـا بـه عنـوان عوامل کنترل بیماری در پرورش میگو کـاهش یافـت و در جستجوی راهبـردهـای جـایگزین بـه‌شـدت تـلاش شـد (Lazado *et al.,* 2015).

جستجو برای روش‌های جایگزین، راه را برای توسـعه و استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عـاملی مـؤثر در جهـت سلامت و بهداشت مدیریت در آبزی‌پـروری همـوار کـرد. پروبیوتیک‌ها، سلول‌های میکروبی زنده، مرده و یا ترکیبـی از آنها هستند که زمـانی‌کـه از طریـق غـذا یـا آب محـیط پرورش وارد بدن آبـزی مـی‌شـوند بـا ارتقـا در وضـعیت سلامت، عملکرد رشد، مصرف بهینه غذا، مقاومت در برابر بیماری، پاسخ به عوامل استرس‌زا یـا تـوان عمـومی بـدن، موجب بهره بردن میزبان می‌شود که عوامل مذکور از طریق بهبود تعادل میکروبی میزبان و یا تعـادل میکروبـی محـیط به‌دست می‌آید (Merrifield *et al.,* 2010). با توجه به روند جدید توسعه آبزی‌پروری سازگار با محیط‌زیست، مصـرف پروبیوتیک با نتایج سودمندی که در مقالات متعدد گزارش شده است، به‌سرعت مورد استقبال قرار گرفـت (van Hai and Fotedar, 2010; Lazado and Caipang, 2014).

پروبیوتیک‌ها با تحریـک سیسـتم ایمنـی، تولیـد مـواد ممانعت‌کننده از رشـد و تکثیـر عوامـل بیمـاری‌زا، اشـغال سطوح روده و ممانعت از استقرار عوامل بیماری‌زا، باعـث افزایش مقاومت به عوامل نامساعد و بیماری‌زا و در نتیجـه ارتقای نرخ بازماندگی می‌شوند. پروبیوتیک‌ها در وهله اول به‌عنوان عامل کنترل بیماری در پرورش میگو در نظر گرفته می‌شدند. در زمینه کنترل بیمـاری، ثابـت شـده اسـت کـه پروبیوتیک‌ها به طور مستقیم قادر بـه مهـار رشـد و تکثیـر عوامل بیماری‌زا و همچنین تحریک تسلط عوامل میکروبی مفید در بدن میزبان و تکثیر آنها مـی‌شـوند (Lazado and Caipang, 2014).

دربارهٔ استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری مطالعات فراوانی انجام شده که تأثیرهای مثبـت ایـن محـرک‌هـا در

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

میگوهای پرورشی با افزایش نرخ بازماندگی، فعالیت فنول‌اکسیداز و سایر شاخص‌های ایمنی اثبات شده است (Liu et al., 2009; Xia et al., 2013; Lazado and Caipang, 2014; Lazado et al., 2015; Sánchez-Ortiz et al., 2015). هرچند McIntosh و همکاران (۲۰۰۰) پس از یک دوره ۹٤ روزه مصرف جیره غذایی حاوی پروبیوتیک، تأثیر معناداری را در نرخ بازماندگی و سایر شاخص‌های رشد و ایمنی در میگوی وانامی مشاهده نکردند. از این‌رو به نظر می‌رسد، تأیید کارایی پروبیوتیک‌ها در مزارع پرورشی موجود، نیاز به بررسی بیشتری دارد. با توجه به اهمیت پرورش میگو در تأمین پروتئین غذایی و تأثیر مکمل‌های غذایی بر بازده تولید از طریق افزایش ایمنی و نرخ بازماندگی، این تحقیق به‌منظور امکان افزایش تولید میگو در استخرهای خاکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مطالعه و نمونه‌برداری: این تحقیق در مرکز توسعه آبزیان دریایی شهید کیانی چوئبده آبادان از پایان جیره کور تا انتهای دوره پرورش در تابستان ۱۳۹۲ انجام شد. بدین منظور از ۳ استخر ۰/۵ هکتاری با تراکم و شرایط نگهداری تقریباً یکسان استفاده گردید. پست‌لاروها از مرکز تکثیر میگوی چوئبده آبادان فراهم شدند. پست‌لارو ۲۰ روزه (PL20) با تراکم ۳۰۰ پست‌لارو در متر مربع به استخرها معرفی شدند. کل دوره در حدود ۱۰۰ روز از انتهای جیره کور تا زمان صید بود. منبع تأمین آب، رودخانه بهمن شیر بود.

این آزمایش در ۳ تیمار و ۳ تکرار طراحی شد.

تیمار ۱ (T.1): شاهد که از جیره غذایی بدون افزودن مکمل پروبیوتیکی در طول دوره استفاده شد.

تیمار ۲ (T.2): پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* با نام تجاری Bactocell (از شرکت Lallemand Animal Nutrition S.A., Blagnac, France) تهیه شد. میزان غلظت اولیه 1×10^{10} واحد تشکیل کلونی در گرم ($cfu\ g^{-1}$) بود.

تیمار ۳ (T.3): پروبیوتیک *Lactococcus lactis* بومی ایران بود. این باکتری از روده ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) استخراج و از طریق آزمایش‌های مختلف (تحمل نسبت به pH، تحمل نسبت به صفرا، ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی و تعیین هویت مولکولی) توان پروبیوتیکی‌اش تأیید شد (Soltani *et al.*, 2013).

برای آماده‌سازی باکتری *L. lactis* و افزودن آن به غذای میگو، به‌اختصار باکتری‌ها در محیط آبگوشت کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شست‌وشو گردیدند و سوسپانسیونی معادل لولهٔ شماره ٤ مک‌فارلند (1×10^{9} $CFU\ ml^{-1}$) تهیه شد و با این غلظت به هر گرم غذا اسپری گردید. همچنین با توجه به غلظت اولیه *P. acidilactici* (1×10^{10} واحد تشکیل کلونی در گرم) و براساس یافته‌های پیشین که یک گرم در کیلوگرم پروبیوتیک (به شکل پودر) دارای غلظت نهایی برابر با ۱۰٦× ۱/۱ ± ۹/۷ کلونی پدیوکوکوس در هر گرم جیره غذایی بود (Castex et al., 2006)، غلظت مورد نظر پروبیوتیک پدیوکوکوس تیمار بررسی شده در غذا (1×10^{9} کلونی در گرم) با شمارش *P. acidilactici* در محیط کشت MRS و با تهیه رقت‌های سریالی به‌دست آمد. برای اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گردید. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد. پس از افزودن پروبیوتیک‌ها، پلت‌ها با ۲ درصد روغن ماهی به‌عنوان حامل برای جلوگیری از حل شدن سریع مواد نام‌برده در آب، پوشانده شدند (Castex et al., 2009).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

بررسی نرخ بازماندگی و ایمنی: در پایان دوره نرخ بازماندگی میگوها براساس رابطه زیر محاسبه شد (Salas-Leiton et al., 2010):

درصد میزان بقا (SR)

$$Survival\ rate = (Nt/N_0) \times 100$$

N_t = تعداد نمونه‌ها در انتهای دوره آزمایش

N_0 = تعداد نمونه‌ها در ابتدای دوره آزمایش.

به‌منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی، ابتدا نیاز به همولنف بود. بدین منظور در پایان دوره صد روزه پرورش، همولنف ۳۰ قطعه میگو خارج و برای جلوگیری از لخته شدن با محلول آنتی‌کواگولاتنت (۲۷ میلی‌مول سیترات سدیم، ۳۳۶ میلی‌مول NaCl، ۱۱۵ میلی‌مول گلوکز و ۹ میلی‌مول EDTA با pH=۷ و دمای ۸ درجه سانتی‌گراد) به نسبت ۱: ۲ (v/v) ترکیب شدند (Li et al., 2009). این مخلوط در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور g ×۳۰۰ سانتریفیوژ گردید (Vargas-Albores et al., 1993). پس از سانتریفیوژ، لایه رویی جدا شده و برای انجام آزمایش‌های سرمی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس میزان لیزوزیم همولنف، میزان پروتئین کل و گلوبولین سرم و نیز فعالیت فنول‌اکسیداز اندازه‌گیری گردید.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که از سوی Ellis (۱۹۹۰) و Nayak (۲۰۱۰) توصیه شده است، استفاده شد. بدین منظور، ۱۵ میکرولیتر همولنف با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *Micrococcus lysodeikticus* ATCC No. 4698 (Sigma) (با نام علمی جدید *M. luteus*) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت ۹٦ خانه‌ای الایزا مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ٦ دقیقه پس از مخلوط‌سازی در طول موج ٤٥٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید (Nayak *et al.*, 2008).

غلظت گلوبولین کل براساس روش Nayak و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. به‌اختصار ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید.

فعالیت فنول‌اکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر با تشکیل رنگدانه DOPA-chrome، پس از اکسیداسیون سوبسترا L-DOPA (Sigma) تعیین شد. در این روش از بافر کاکودیلات (CAC) و آنزیم محرک تریپسین (۱ درصد) (Sigma) استفاده شد و در انتها میزان جذب در طول موج ٤٩٠ نانومتر خوانده شد. تشکیل DOPA-chrome پس از ۰، ۵ و ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیمی معادل تغییر در ۰/۰۰۰۱ در جذب/دقیقه/میلی‌گرم از پروتئین در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد است (Söderhäll and Hall, 1984). هر آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

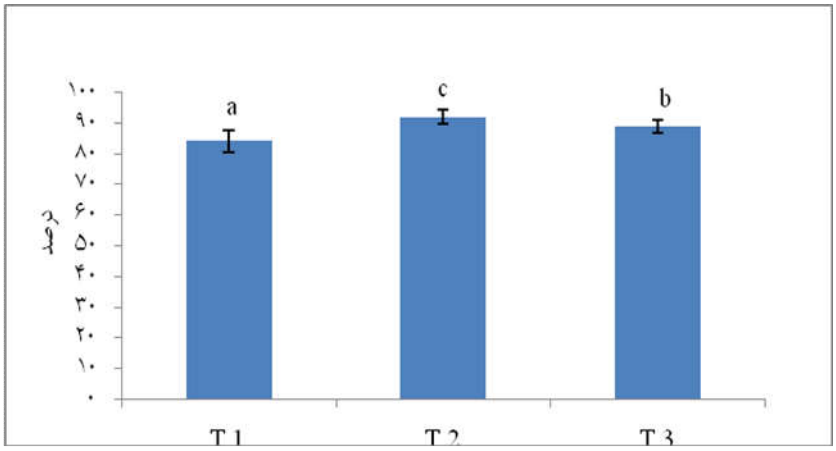
تجزیه و تحلیل داده‌ها و آنالیز آماری: داده‌ها براساس میانگین و خطای استاندارد بیان شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه نرم‌افزار SPPS نسخه شماره ۲۱ استفاده شد. برای بررسی معنادار بودن تفاوت میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنادار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

نرخ بازماندگی: نرخ بازماندگی در میگوهای وانامی در انتهای دوره محاسبه شد. بیشترین نرخ بقا در تیمار پدیوکوکوس و پس از تیمار لاکتوکوکوس به‌دست آمد، به‌طوری که نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنادار بودند. در این میان پروبیوتیک پدیوکوکوس بهترین بازده را نشان داده است. در شکل ۱ نرخ بازماندگی میگوهای وانامی در تیمارهای مختلف ارائه شده است.



شکل ۱ نرخ بازماندگی میگوهای وانامی (*L. vannamei*) در تیمارهای شاهد (T_1)، *Pediococcus acidilactici* (T_2) و *Lactococcus lactis* (T_3) (تابستان ۱۳۹۲).

*حروف غیرهمنام، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در بین تیمارها است (p<۰/۰۵).

فاکتورهای ایمنی: در انتهای دوره، فعالیت لیزوزیم همولنف در تیمارهای مختلف محاسبه شد. براساس نتایج، بین تیمارها از لحاظ آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. گفتنی است که در بررسی حاضر استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی میگوهای وانامی تأثیر قابل توجهی بر فعالیت لیزوزیم سرم میگوی وانامی نداشته است، هر چند در تیمار پدیوکوکوس نسبت به سایر تیمارها اندکی افزایش فعالیت لیزوزیم مشاهده شد (p> ۰/۰۵). در جدول ۱ میانگین فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف آزمایش ارائه شده است.

جدول ۱ میانگین (Means ±SD) فعالیت لیزوزیم (واحد در میلی‌لیتر) همولنف میگوهای وانامی (*L. vannamei*) در تیمارهای شاهد (T_1)، *Pediococcus acidilactici* (T_2) و *Lactococcus lactis* (T_3) (تابستان ۱۳۹۲).

تیمار شاهد (T.1)	تیمار پدیوکوکوس (T.2)	تیمار لاکتوکوکوس (T.3)
۲۰±۱/٤[a]	۲۰/۲±۱/۵[a]	۲۰/۵±۰/۹[a]

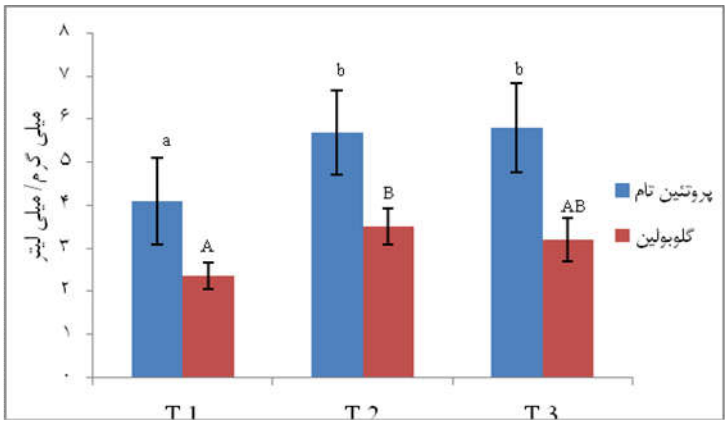
*حروف غیرهمنام، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در بین تیمارها است (p<۰/۰۵).

مقدار پروتئین تام همولنف تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس از لحاظ آماری دارای اختلاف معنادار در مقایسه با تیمار شاهد بود (p<۰/۰۵)، به‌طوری که بیشترین مقدار پروتئین در تیمار لاکتوکوکوس (۰/۰۳ ± ۵/۸) اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

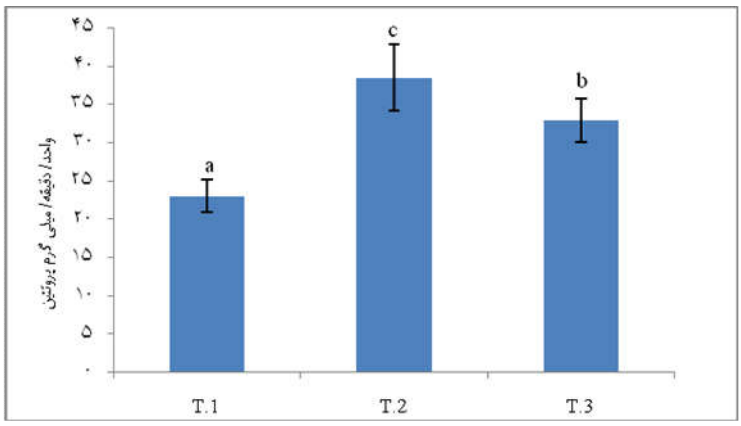
نتایج مربوط به مقایسه میزان پروتئین و گلوبولین همولنف در تیمارهـای بررسـی شـده در شـکل ۲ آورده شـده اسـت. همان‌طور که مشخص است، بیشترین میـزان گلبـولین تـام در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس بـه‌دسـت آمد که دارای اختلاف معنادار با تیمار شاهد بودند (p<۰/۰۵).



شکل ۲ مقایسه (Means ±SD) پروتئین تام و گلوبولین در میگوی وانامی (*L. vannamei*) در تیمارهای شاهد (T_1)، *Pediococcus acidilactici* (T_2) و *Lactococcus lactis* (T_3) (تابستان ۱۳۹۲).

حروف کوچک نشان‌دهندهٔ تفاوت در میزان پروتئین تام در بین تیمارها و حروف بزرگ نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در میزان گلوبولین همولنف برای هر تیمار است.

شکل ۳ نتایج میـزان فعالیـت آنـزیم فنـول‌اکسـیداز در گـروه‌هـای تغذیـه شـده پروبیـوتیکی را نشـان مـی‌دهـد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم فنـول‌اکسـیداز تیمارهایی که پروبیوتیک دریافت کرده‌انـد، در مقایسـه بـا گروه کنترل افزایش نشان داده است (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که در تیمار پدیوکوکوس بیشترین فعالیت انـدازه‌گیـری شـد. پـس از آن تیمـار لاکتوکوکـوس بـود، هـر چنـد از تیمـار پدیوکوکوس فعالیت کمتری نشان داده است (p<۰/۰۵).



شکل ۳ میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در میگوی وانامی (*L. vannamei*) در تیمارهای شاهد (T_1)، *Pediococcus acidilactici* (T_2) و *Lactococcus lactis* (T_3) (تابستان ۱۳۹۲).

حروف غیرهمنام، نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در بین تیمارها است (p<۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

بحث

پروبیوتیک‌ها از راه‌های مختلف به میزبان سود می‌رسانند. این میکروارگانیسم‌های مفید قادر به تولید مواد بازدارنده هستند که می‌تواند به طور مستقیم به پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی آسیب برساند (Iyapparaj et al., 2013). حفاظت از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا پس از مصرف پروبیوتیک می‌تواند از طریق مهار مستقیم عوامل بیماری‌زا و یا به قابلیت پروبیوتیک‌ها در تنظیم سیستم ایمنی بدن میگو مرتبط باشد (Fu *et al.*, 2011).

از جمله فواید پروبیوتیک‌ها می‌توان به اثر مثبت آنها در ارتقای سلامت و بهبود بقای میزبان اشاره کرد (Wang and Chen, 2006). استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بقای میگوها از طریق حذف رقابتی عوامل بیماری‌زا در شرایط پرورش می‌شوند. پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق محدود کردن باکتری‌های مضر 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 به‌وسیلهٔ تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و فعالیت ضدویروسی قادر به افزایش بقای آبزیان باشند (Saurabh and Sahoo 2008). در بررسی انجام شده نرخ بازماندگی در انتهای دوره در تیمارهای پروبیوتیکی (بیشترین بازماندگی در تیمار پدیوکوکوس) دارای اختلاف معناداری نسبت به تیمار شاهد بودند. نرخ بقای بالاتر در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به تیمار شاهد، ممکن است به علت ارتقای سیستم ایمنی میگو به‌وسیلهٔ پروبیوتیک‌ها باشد. همچنین افزایش بازماندگی در تیمارهای پروبیوتیکی می‌تواند به علت تولید ترکیبات ضدمیکروبی به‌وسیلهٔ باکتری‌های مفید باشد که این ترکیبات باکتری‌های بیماری‌زا را (که به‌طور طبیعی در بدن میگو و یا محیط زندگی حضور دارند) مهار می‌کند که با برخی نتایج هم‌خوانی دارد (Fernandez et al., 2011; Nurhayati et al., 2015; Widanarni et al., 2015).

به‌رغم نبود ایمونوگلوبولین‌ها، میگوها برای مقابله با عوامل بیماری‌زا سیستم ایمنی خود را از روش‌های مختلف توسعه دادند که یکی از آنها سیستم پروفنول‌اکسیداز (proPO) است (Fagutao et al., 2009) که در واقع بهترین روش بررسی سیستم آنزیمی همولنف سخت‌پوستان می‌باشد. فنول‌اکسیداز، آنزیم نهایی در سیستم proPO است و به‌وسیله سلول‌های پلی‌ساکارید نظیر ۳،۱ -گلوکان، لیپوپلی‌ساکارید و یا پپتیدوگلیکان میکروارگانیسم‌ها از طریق تشخیص الگوی پروتئین‌ها فعال می‌شود (Balasundaram et al., 2012). فنول‌اکسیداز در کنترل بار باکتریایی همولنف (Fagutao et al., 2009)، شناسایی عوامل غیرخودی و حفاظت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (Amparyup et al., 2009) نقش محوری دارد. فعالیت فنول‌اکسیداز می‌تواند به‌عنوان شاخص سلامت مطرح باشد، زیرا تغییرات این فاکتور به‌طور مستقیم به وضعیت بیماری و تغییرات محیطی وابسته است. تحقیقات نشان دادند که اندکی کاهش فعالیت این آنزیم از حد طبیعی منجر به کاهش مقاومت میگو نسبت به عوامل بیماری‌زا می‌شود (Wang and Chen, 2006).

در تحقیقی بر میگوی مونودون، از دو نوع پروبیوتیک *Bacillus firmus* و *B. coagulans* استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش فعالیت فنول‌اکسیداز در میگوها گردید (Balasundaram et al., 2012). نتایج مشابهی در استفاده از پروبیوتیک‌ها در میگوی وانامی (Li et al., 2009; Nimrat et al., 2013; Xia et al., 2013)، *P. monodon* (Rengpipat et al., 2000)، *P. japonicas*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

(Zhang et al., 2011)، *L. stylirostris* (Le Moullac et al., 1998)، *Fenneropenaeus chinensis* (Zhang et al., 2009) و *M. rosenbergii* (Rahiman et al., 2010) و خرچنگ *P. clarkia* (Mohamed et al., 2015) گزارش شده است. گزارش‌های مذکور موافق با یافته‌های این تحقیق است، به گونه‌ای که میزان فعالیت آنزیم در تیمار پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس دارای اختلاف معنادار با تیمار شاهد بود و بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار پدیوکوکوس مشاهده شد.

لیزوزیم با اثر بر پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را متلاشی و بدین ترتیب به‌طور غیراختصاصی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. باکتری‌های گرم منفی نیز اگرچه به‌طور مستقیم تحت تأثیر لیزوزیم قرار نمی‌گیرند، اما با اثر بر لایه پپتیدوگلیکان، انهدام باکتری‌های گرم منفی را تسریع می‌بخشند. لیزوزیم در Opsonization مشارکت دارد که فرایند پاسخ ایمنی است و سبب تسهیل عمل فاگوسیتوز می‌شود (محمدیان، ۱۳۹۲). لیزوزیم به‌طور گسترده‌ای منجر به تسریع هیدرولیز دیوار سلول باکتری‌ها شده و به عنوان یک مولکول ایمنی ذاتی غیراختصاصی در برابر تهاجم پاتوژن‌ها فعالیت می‌کند (Subramanian et al., 2014).

لیزوزیم‌های موجود در خانواده پنائیده در برابر گونه‌های مختلفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، از جمله گونه‌های بیماری‌زای ویبریو فعالیت می‌کنند (de-la-Re-Vega et al., 2006). Liu و دیگران (۲۰۰۹) اعلام کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌صورت افزودنی به آب پرورش میگوی وانامی موجب افزایش فعالیت لیزوزیم شد که با یافته‌های Son و دیگران (۲۰۱۱) هم‌خوانی دارد. در تحقیقی از سوی Subramanian و همکاران (۲۰۱٤)، افزایش در فعالیت لیزوزیم در میگوی مونودون گزارش شد. در بررسی Blanca و همکاران (۲۰۱۳) از ترکیبی از لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان پروبیوتیک استفاده شد، ولی افزایشی در فعالیت لیزوزیم مشاهده نشد. در بررسی حاضر نیز مصرف پروبیوتیک‌ها منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم نگردید. به نظر می‌رسد مصرف پروبیوتیک‌ها در میگوی وانامی نتوانسته تأثیر مناسبی در ارتقای این فاکتور ایمنی داشته باشد و موجب تحریک میزبان به افزایش فعالیت لیزوزیم نشده‌اند.

فاکتور ایمنی دیگر بررسی شده، مقدار پروتئین و گلوبولین همولنف بوده است. فراوان‌ترین ماده حل شده در پلاسما را گروهی از پروتئین‌های پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها (IgM) تشکیل می‌دهند. استفاده از پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم خون می‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی استفاده شود (محمدیان، ۱۳۹۲). یافته‌های این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس (کمتر از تیمار پدیوکوکوس)، باعث افزایش پروتئین تام و گلوبولین در میگوهای وانامی شد. همان‌طور که از نتایج این تحقیق مشخص است، استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس تأثیر مناسبی بر سطح پروتئین تام و گلوبولین همولنف داشته است که در نهایت منجر به افزایش ایمنی غیراختصاصی در میگوهای وانامی گردید.

با توجه به یافته‌های تحقیق می‌توان بیان داشت که عملکرد پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک مقبول بوده است. همچنین حساسیت‌های موجود در صنعت پرورش میگوی کشور نظیر بازدهی پایین تولید در واحد سطح، شیوع بیماری‌ها و گاهی تلفات صددرصدی مزارع پرورش، مکمل‌های غذایی می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و به‌طور گسترده در مقیاس تجاری

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

استفاده شوند. همچنین از لحاظ اقتصادی نسبت به مواد شیمیایی مقرون به‌صرفه بوده، ضمن کاهش هزینه‌ها و آثار مخرب زیست‌محیطی، نتایج مطلوبی نیز به همراه دارند. با این حال پیشنهاد می‌شود، زنده ماندن باکتری‌ها، توانایی چسبیدن و کلونیزه شدن در روده میگوها در دماهای مختلف بررسی شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از رئیس اداره میگوی شیلات استان خوزستان جناب آقای دکتر مهرداد محمدی‌دوست، کارکنان محترم مرکز توسعه آبزیان دریایی شهید کیانی و جناب آقای دکتر تکاور محمدیان استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

محمدیان، ت. ۱۳۹۲. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک‌کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*). دانشگاه شهید چمران اهواز، پایان‌نامه دکتری.

Amparyup, P., Charoensapsri, W. and Tassanakajon, A. 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 247-256.

Balasundaram, A., Rathna Kumari, P., Masilamani, V. and Kolanchinathan, P. George J., 2012. Immunomodulation of Vibrio-Infected *Penaeus monodon*, Subjected to Probiotic Feed supplementation. *Proceedings of the National Seminar on Current Perspectives in Biological Sciences* (NSOCPIBS – 2012), 11 & 12 October 2012.

Blanca, O. P.A., Antonio, L.G., Jesús, A. F.C., Ma. del, C.F.M. and Héctor A. G.O. 2013. Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology,* 12(21): 3366-3375.

Castex, M., Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P. and Usache, V. 2006. Feeding evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) in sub adult shrimp *Litopenaeus stylirostris:* microbial, nutritional and zootechnical aspects. Book of AbstractWAS Annual Meeting, 9–13 May 2006. Florenze, Italia.

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.

De la Re-Vega, E., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M.E. and Sotelo-Mundo, R.R. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus, Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish and Shellfish Immunology,* 20:405-408.

Ellis, A. E. 1990. Lysozyme Assays. *Techniques in Fish Immunology*, Pp.101-103.

FAO, 2013. The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, 2013.

Fagutao, F.F., Koyama, T., Kaizu, A., Saito-Taki, T., Kondo, H., Aoki, T. and Hirono, I. 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS Journal*, 276: 5298-5306.

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.

Fu, L.L., Wang, Y., Wu, Z.C. and Li, W.F. 2011. *In vivo* assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture,* 322-323: 33-38.

Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G. and Palavesam, A. 2013. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97: 405-430.

Nayak, B., Kumar, S., Collins, P. L. and Samal, S. K. 2008. Molecular characterization and complete genome sequence of avian paramyxovirus type 4 prototype strain duck/Hong Kong/D3/75. *Virology Journal*, 5: 124.

Nayak, S. K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41:1553-1573.

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.

Nurhayati, D., Widanarni. and Yuhana, M. 2015. Dietary synbiotic influence on the growth performances and immune responses to co-infection with infectious myonecrosis virus and *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fish and Aquatic Sciences*, 10: 13-23.

Rahiman, K. M. M., Jesmi, Y., Thomas, A. P. and Hatha, A. A. M. 2010. Probiotic effect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 41: 120-134.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture*, 191:271-88.

Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D. V., Planas, J., Infante, C., Cañavate, J. and Manchado, M. 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response . *Fish and Shellfish Immunology,* 28: 296-302.

Sánchez-Ortiz1, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M. d. C. and Mazón-Suástegui1, J.M. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems,* 9(12): 1-10.

Lazado, C.C. and Caipang, C.M.A. 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish and Shellfish Immunology,* 39: 78-89.

Lazado, C. C., Lacsamana, J.I. and Caipang, Ch. M.A. 2015. 5. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines,* PP. 89-114.

Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. and Levy, P. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 621–629.

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

Liu C. H., Chiu, C. S., Lin, 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,* 107:1031-41.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M. and Ringo, E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302: 1-18.

McIntosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., McKee, D. A., Horowitz, S. and Horowitz, A. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21: 215-227.

Mohamed, H. M., El-Sayed, T. R., Wesam, M. S. and Mai, L. Y. 2015. Efficacy of probiotics, prebiotics, and immunostimulant on growth performance and immunological parameters of *Procambarus clarkia* juveniles. *Journal of Basic and Applied Zoology*, 69: 17-25.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G. and Mohanta, K.N. 2013.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 106A: 299–303.

van Hai, N. and Fotedar, R. 2010. A review of probiotics in shrimp aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 22: 251-266.

Wang, F. I. and Chen, J. C. 2006. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* under temperature stress. *Aquaculture*, 258: 34–41.

Widanarni, W., Nopitawati, T. and Jusadi, D. 2015. Screening of Probiotic Bacteria Candidates from Gastrointestinal Tract of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* and their Effects on the Growth Performances. *Research Journal of Microbiology*, 10 (4): 145-157.

Xia, Z., Zhu, M. and Zhang, Y. 2013. Effects of the probiotic Arthrobacter sp. CW9 on the survival and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Letters in Applied Microbiology*, 58: 60-64. **Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X. and 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.

Latin American Journal of Aquaculture Research, 43(1): 123-136.

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

Söderhäll, K. and Hall, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *BBA-Bioenergetics,* 797: 99-104.

Soltani, M., Pourkazemi, M., Ahmadi, M.R., Taherimirghead, A., Merrifield, D. L. and Masouleh, A. S. 2013. Genetic diversity of lactic acid bacteria in the intestine of Persian sturgeon fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology*, 3: 494-498.

Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H. and Cheng, W. 2011. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26:691-8.

Subramanian, K., Balaraman, D., Balachandran, D. N., Thirunavukarasu, R., Gopal, S., Renuka, P. S. and Kumarappan, A. 2014. Immune response of shrimp (*Penaeus monodon*) against *Vibrios furnissii* pathogen. *Journal of Coastal Life Medicin*, 2(4): 281-286.

Vargas-Albores, F., Gúzman, M. A. and Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 3, Autumn 2016

Comparison of *Pediococcus acidilactici* and *Lactococcus lactis* as probiotic on survival rate and some immunological parameters of White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

S Ahmadi[1*], M Soltani[2], M Shamsaie[3], H Rajabi Islami[4], R Peyghan[5]

1, 3, 4. Department of Fisheries, College of Agricultural and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 14515/775, Tehran, Iran.

2. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran, Iran.

5. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Received: 06.12.2015 Accepted: 18.06.2016

*Corresponding author: sara_ahmadi_61@yahoo.com

Abstract:

The effects of *Pediococcus acidilactici* and *Lactococcus lactis* was evaluated on survival rate and some immunological parameters of *L. vannamei* during three months of cultivations. Treatments included control group, *Pediococcus* and *Lactococcus* treatments and probotic treatments fed at 1×10^9 cfu g^{-1}. The results indicated that probiotics increased the survival rate ($P<0.05$). The best immune performance was shown in the probiotics treatments; phenoloxidase activity, proteins, and globulin hemolymph showed significant difference compared to the control treatment ($P<0.05$), whereas there were no significant influence on lysozyme activity ($P\geq0.05$). In general, pediococcus treatment showed the best performance in enhancing the immune responses and survival rate.

Keywords: *Pediococcus acidilactici, Lactococcus lactis,* Survival rate, Immunological parameters, *Litopenaeus vannamei*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-13]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.3.7.6]