

معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

با یاری از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خدا است و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظر به اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، ما دانشجویان و اعضاء هیات علمی واحدهای دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.

اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهیدگان (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق

اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه همکاران پژوهش

اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش

اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار

اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق

اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب نقد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی

اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به همکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.

اصل برائت: التزام به برائت جویی از هرگونه رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شائبه های غیر علمی می آلایند.

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

تعهد نامه اصالت رساله

اینجانب سارا احمدی دانش آموخته مقطع دکترای تخصصی در رشته شیلات که در تاریخ ۱۳۹۳/۶/۲۵ از رساله خود تحت عنوان مقایسه تاثیر پروبیوتیک *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر شاخص‌های رشد، بقاء و فعالیت آنزیمی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با کسب نمره ۱۹/۷۵ و درجه عالی دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می‌شوم:

۱) این رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و....)استفاده نموده ام. مطابق ضوابط و رویه موجود، نام مورد استفاده و سایر مشخصات آن در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

۲) این رساله قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم، سطح پایین تر یا بالاتر)در سایر دانشگاه‌ها و موسسات آموزش عالی ارائی نشده است.

۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم ازچاپ کتاب، ثبت اختراع و.... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می‌پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی:

سارا احمدی

دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات
رساله دکتری (Ph.D) رشته شیلات

عنوان:

مقایسه تاثیر پروبیوتیک *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر شاخص‌های رشد، بقاء و فعالیت آنزیمی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

استادان راهنما :
دکتر مهدی سلطانی
دکتر مهدی شمسایی مهرجان

استادان مشاور :
دکتر هومن رجبی اسلامی
دکتر رحیم پیغان

نگارش :
سارا احمدی

تابستان ۱۳۹۳

با تشکر و قدردانی از

اساتید راهنما جناب آقای دکتر مهدی سلطانی و جناب آقای دکتر مهدی شمسایی و اساتید مشاور جناب آقای دکتر هومن رجبی اسلامی و جناب آقای دکتر رحیم پیغان که با راهنمائی های استادانه و ارزشمند خویش اینجانب را در انجام این پروژه یاری نمودند.

ریاست محترم اداره میکوی شیلات خوزستان جناب آقای دکتر مهرداد محمدی دوست و پرسنل محترم مرکز توسعه آبزیان دریایی شهید کیانی که اگر مساعدت ایشان نبود، اجرای این پایان نامه امکان پذیر نبود.

جناب آقای دکتر تکاور محمدیان استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که در اجرای این پایان نامه نهایت راهنمایی و همکاری را با اینجانب داشته اند.

جناب آقای مهندس احمد تقوی ریاست بخش تحقیقات بندپایان انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی اهواز و پرسنل محترم که در انجام بخشی از پایان نامه صبورانه مساعت نمودند.

تقدیم به

خدایی که آفرید

جهان را؛ انسان را؛ عقل را؛ علم را؛ معرفت را؛ عشق را

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

چکیده ۱

فصل اول: کلیات تحقیق

۱ ـ ۱ – مقدمه ۳

۱ ـ ۲ – بیان مساله ۵

۱–۲–۱ اهمیت و ضرورت تحقیق ۸

۱–۲–۲ اهداف تحقیق ۱۰

۱–۲–۳ فرضیه‌های تحقیق ۱۰

۱–۳– تعریف واژه‌ها و اصطلاحات فنی و تخصصی ۱۱

فصل دوم: مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق

۲–۱– مروری بر سابقه تحقیق ۱۳

۲–۲– معرفی گونه میگوی سفید غربی ۱۷

۲–۲–۱ طبقه‌بندی ۱۷

۲–۲–۲ بیولوژی میگوی وانامی ۱۷

۲–۲–۳ پراکنش ۱۸

۲–۲–۴ مزیت‌های پرورشی میگوی وانامی ۱۹

۲–۳– مروری بر سیستم ایمنی میگوها ۲۱

۲–۳–۱ مکانیسم‌های دفاعی در سخت‌پوستان ۲۲

۲–۳–۲ سلول‌های خونی (هموسیت‌ها) و وظایف آن‌ها ۲۲

۲–۳–۲–۱ سلول‌های هیالینه (هیالونوسیت‌ها) ۲۳

۲–۳–۲–۲ سلول‌های نیمه‌گرانولار ۲۳

۲–۳–۲–۳ سلول‌های گرانولار ۲۳

۲–۳–۳ انواع پاسخ‌های دفاعی و ایمنی در سخت‌پوستان و سازوکارهای درگیر ۲۳

۲-۳-٤ ایمنی سلولی..... ۲٤
۲-۳-٤-۱ فاگوسیتوز..... ۲٤
۲-۳-٤-۲ تشکیل ندول..... ۲٤
۲-۳-٤-۳ تشکیل کپسول..... ۲۵
۲-۳-۵ ایمنی مایعی..... ۲۵
۲-۳-۵-۱ لکتین‌ها..... ۲۵
۲-۳-۵-۲ لیزوزیم..... ۲٦
۲-۳-۵-۳ سیستم فعال‌کننده‌ی پروآنزیم پروفنل‌اکسیداز..... ۲٦
۲-٤ پروبیوتیک‌ها و انواع آن..... ۲۸
۲-٤-۱ میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش..... ۲۸
۲-٤-۲ تعریف و تاریخچه‌ی پروبیوتیک‌ها..... ۲۸
۲-٤-۳ معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها..... ۳۰
۲-٤-٤ مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها..... ۳۰
۲-٤-٤-۱ رقابت اختصاصی..... ۳۰
۲-٤-٤-۲ کمک به هضم مواد غذایی..... ۳۱
۲-٤-٤-۳ تأثیر بر کیفیت آب..... ۳۱
۲-٤-٤-٤ تقویت پاسخ‌های ایمنی..... ۳۱
۲-٤-٤-۵ اثرات ضد ویروسی..... ۳۲
۲-۵ محرک‌های سیستم ایمنی..... ۳۲
۲-۵-۱ خطرات استفاده از محرک‌های ایمنی در پرورش آبزیان..... ۳۲
۲-۶ جمعیت میکروبی دستگاه گوارش آبزیان..... ۳۳
۲-۶-۱ حضور باکتری اسید لاکتیک در دستگاه گوارش..... ۳۴
۲-٦-۲ خصوصیات لاکتوباسیلوس‌ها..... ۳۴
۲-۷ عمل‌کرد دستگاه گوارش..... ۳۵
۲-۷-۱ فرآیند هضم توسط آنزیم‌های گوارشی..... ۳٦
۲-۸ آنزیم‌ها..... ۳۷
۲-۸-۱ نقش و اهمیت آنزیم‌ها..... ۳۷
۲-۸-۲ آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی..... ۳۸

۲-۸-۲-۱ آلفا-آمیلاز..... ۳۸
۲-۸-۲-۲ پروتئاز قلیایی..... ۳۸
۲-۸-۲-۳ آلکالین فسفاتاز..... ۳۸
۲-۸-۲-٤ لیپاز ۳۸
۲-۸-۲-۵ تریپسین..... ۳۹
۲-۸-۲-٦ کیموترپسین..... ۳۹
۲-۹ پروبیوتیک‌های مورد بررسی..... ٤۰
۲-۹-۱ باکتری پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی..... ٤۰
۲-۹-۲ باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس..... ۴۱
۲-۱۰ ویتامین ث..... ۴۱
۲-۱۱ خصوصیات کلی خانواده ویبریوناسه..... ٤۳
۲-۱۱-۱ خصوصیات کلی باکتری ویبریو..... ٤۳
۲-۱۱-۲ گونه‌های مهم خانواده ویبریوناسه..... ٤٤
۲-۱۱-۳ خصوصیات باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس..... ٤٤

فصل سوم: روش اجرای تحقیق

۳-۱ طراحی آزمایش..... ۴۶
۳-۱-۱ مکان و زمان تحقیق..... ۴۶
۳-۱-۲ تیمار بندی..... ۴۶
۳-۱-۳ غذادهی..... ۴۷
۳-۱-۴ نحوه غذادهی..... ۴۷
۳-۱-۵ دفعات و میزان غذادهی ۴۷
۳-۱-۶ زیست‌سنجی..... ۴۸
۳-۱-۷ انتقال نمونه‌ها به صورت زنده..... ۴۸
۳-۲ اندازه‌گیری شاخص‌های رشد..... ۴۹
۳-۳- تعیین فعالیت آنزیم‌های پانکراسی..... ۵۰
۳-۳-۱ استخراج آنزیم روده‌ای..... ۵۱
۳-۳-۲ سنجش غلظت پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده ۵۱

۳-۳-۳ سنجش فعالیت آنزیم تریپسین ۵۲
۳-۳-۴ سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین..... ۵۳
۳-۳-۵ سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ۵۳
۳-۳-۶ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز ۵۴
۳-۳-۷ سنجش فعالیت پروتئاز..... ۵۶
۳-۳-۸ سنجش فعالیت فسفاتاز قلیایی..... ۵۷
۳-٤- ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها و ویتامین ث بر سیستم ایمنی..... ۵۸
۳-٤-۱ همولنف‌گیری..... ۵۸
۳-٤-۲ اندازه‌گیری لیزوزیم همولنف..... ۵۹
۳-٤-۳- اندازه‌گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما..... ۵۹
۳-۴-۴- اندازه‌گیری فعالیت فنول‌اکسیداز..... ۶۰
۳-۵- چالش باکتریایی..... ٦۰
۳-۵-۱ محاسبه LD_{50}..... ٦۰
۳-۵-۲ انجام چالش ٦۱
۳-٦- شمارش تام باکتری‌ها..... ٦۱
۳-۷- بافت‌شناسی روده..... ٦۲
۳-۷-۱ نمونه‌برداری..... ٦۲
۳-۷-۲ مراحل آماده سازی بافت..... ٦۳
۳-۸- آنالیز شیمیایی ترکیب لاشه ٦۳
۳-۸-۱ اندازه‌گیری میزان خاکستر..... ٦۳
۳-۸-۲ اندازه‌گیری رطوبت..... ٦٤
۳-۸-۳ اندازه‌گیری پروتئین..... ٦٤
۳-۸-٤ اندازه‌گیری چربی ٦۵
۳-۹- تجزیه و تحلیل آماری ٦۵

فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها

۴-۱ پارامترهای کیفی آب..... ۶۷
۴-۲ نتایج مربوط به ارزیابی رشد و بازماندگی در تیمارها..... ۶۸
۴-۲-۱ نتایج مربوط به وزن ۶۸
۴-۲-۱-۱ افزایش رشد ۶۸
٤-۲-۱-۲ میزان رشد نسبی ۶۹
٤-۲-۱-۳ نرخ رشد ویژه ۶۹
٤-۲-۱-٤ نرخ کارایی پروتئین ۷۰
٤-۲-۱-۵ ضریب تبدیل غذایی ۷۰
۴-۲-۲ نتایج مرتبط با شاخص‌های طول و نرخ بازماندگی میگوهای وانامی ۷۱
۴-۲-۲-۱ افزایش طول ۷۱
٤-۲-۲-۲ طول کاراپاس ۷۲
۴-۲-۲-۳ نرخ بازماندگی ۷۲
۴-۳- آزمایشات ارزیابی آنزیم‌های گوارشی ۷۳
۴-۳-۱ بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ۷۳
۴-۳-۲ بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز ۷۴
٤-۳-۳ بررسی فعالیت آنزیم لیپاز ۷۵
۴-۳-۴ بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۷۵
۴-۳-۵ بررسی فعالیت آنزیم تریپسین ۷۶
٤-۳-٦ بررسی فعالیت آنزیم کیموتریپسین ۷۶
۴-۴- یافته‌های ایمنی‌شناسی ۷۷
۴-۴-۱ فعالیت لیزوزیم ۷۷
۴-۴-۲ میزان پروتئین تام و گلوبولین همولنف ۷۷
۴-۴-۲-۱ پروتئین تام ۷۷
۴-۴-۲-۲ گلوبولین همولنف ۷۸
٤-٤-۲-۳ میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز ۷۸
۴-۵- نتایج چالش باکتریایی ۷۹

۴-۶- آزمایش‌های باکتریایی روده ۸۱
۴-۶-۱ میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده ۸۱
٤-٦-۲ میزان باکتری‌های کل در روده ۸۱
۴-۷- هیستولوژی بافت روده ۸۲
۴-۸- آنالیز لاشه ۸۳

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- پارامترهای کیفی آب ۸۶
۵-۲- فاکتورهای رشد ۸۷
۵-۳- نرخ بقا ۸۸
۵-۴- آنزیم‌های گوارشی ۸۹
۵-۵- ایمنی ۹۲
۵-۵-۱ فعالیت فنول اکسیداز ۹۳
۵-۵-۲ فعالیت لیزوزیم ۹۵
۵-۵-۳ بررسی میزان پروتئین تام ۹٦
۵-۵-۴ چالش باکتریایی ۹۶
۵-٦- ترکیب لاشه ۹۸
۵-۷- فلور باکتریایی ۹۹
۵-۸- بافت‌شناسی ۱۰۲
۵- ۹- نتیجه‌گیری ۱۰٤
۵-۱۰- پیشنهادات..... ۱۰٤
فهرست منابع فارسی ۱۰۵
فهرست منابع غیر فارسی ۱۰۷
چکیده انگلیسی ۱۲٤

فهرست جداول

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۲-۱- رده بندی میگوی وانامی ۱۷
جدول ۳-۱- ترکیب غذایی غذای مورد استفاده در طول دوره پرورش ٤۷
جدول ۳-۲- غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی ۵۱
جدول ۴-۱- بررسی پارامترهای کیفی آب استخرهای پروروش میگوی وانامی در طول دوره آزمایش..... ۶۸
جدول ٤-۲- مقایسه شاخص‌های رشد وزنی در میگوی وانامی بین تیمارهای مورد بررسی..... ۷۱
جدول ۴-۳- مقایسه شاخص‌های رشد طولی و بازماندگی در میگوی وانامی بین تیمارهای مورد بررسی ۷۳
جدول ۴-۴- فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای مختلف ۷۷
جدول ۴-۵ : میانگین فعالیت لیزوزیم همولنف میگوهای وانامی در تیمارهای مختلف ۷۷
جدول ۴-۶: میانگین تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک در بافت روده..... ۸۱
جدول ۴-۷- مقایسه ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌های بافت روده در تیمارهای مختلف ۸۲
جدول ۴-۸- مقایسه نتایج آنالیز لاشه در تیمارهای چهارگانه ۸٤

فهرست نمودارها

عنوان **شماره صفحه**

نمودار ۱-۱- تولیدات آبزی‌پروری جهان بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۱ ..... ٤
نمودار ۳-۱- نمودار منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی ۵۲
نمودار ۳-۲- منحنی استاندارد مالتوز ۵۴
نمودار ۴-۱- مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در تیمارهای چهارگانه ۷۴
نمودار ۴-۲- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف ۷۴
نمودار ۴-۳- مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای مختلف ۷۵
نمودار ۴-۴- مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف ۷۶
نمودار ٤-۵- نمودار مقایسه پروتئین تام و گلوبولین در میگوی وانامی برای تیمارهای چهارگانه ۷۸
نمودار ٤-٦- نمودار میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در میگوی وانامی برای تیمارهای چهارگانه..... ۷۹
نمودار ۴-۷- تلفات میگوهای وانامی پس از چالش با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۸۰

فهرست اشکال

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۲-۱- کلونی‌های جنس ویبریو بر روی محیط TCBS ٤٣
شکل ۳-۱- الف- میگوی وانامی ب- بیومتری میگوی وانامی ۴۸
شکل ۳-۲- الف) استاندارد پروتئین ب) استاندارد مالتوز ۵۴
شکل ۳-۳- الف) امولسیون روغن زیتون ب) افزودن معرف تیمول فتالئین ٥٦
شکل ۳-۴- همولنف میگوی وانامی پس از آماده‌سازی ۵۸
شکل ۳-۵- افزودن سرم خون به باکتری میکروکوکوس و دستگاه الایزاریدر ۵۹
شکل ۳-۶- تزریق باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ۶۱
شکل ۳-۷- جار بی‌هوازی و کشت فلور باکتریایی روده ۶۲
شکل ۳-۸- باکتری‌های لاکتوباسیلوس در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی۱۰۰۰برابر ۶۲
شکل ۴-۱- الف) میگوهای مورد چالش ب) میگوی بیمار ۸۰
شکل ۴-۲- ساختار میکروسکوپی روده میگو ۸۳

چکیده

این تحقیق در مرکز توسعه آبزیان دریایی شهید کیانی منطقه‌ی چوئیبده‌ی آبادان به منظور ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌های *Pediococcus acidilactici* و *Lactococcus lactis* و ویتامین C بر فاکتورهای رشد، بازماندگی، فعالیت‌های آنزیمی و پاسخ‌های ایمنی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در یک دوره‌ی پرورش ۳ ماهه انجام گردید. تیماربندی شامل تیمار شاهد، تیمار پدیوکوکوس، تیمار لاکتوکوکوس با جیره غذایی حاوی ۱×۱۰^{۹} واحد کلنی در گرم و تیمار ویتامین C بود. پس از اتمام دوره‌ی پرورش، شاخص‌های رشد به صورت ماهانه، فاکتورهای ایمنی، آنزیم‌های گوارشی، بافت‌شناسی روده، آنالیز لاشه و فلور باکتریایی روده (شمارش کلی و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها باعث بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد در میگوی وانامی گردید، به طوری که مناسب‌ترین افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، رشد نسبی، کارایی پروتئین و ضریب تبدیل غذایی در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن لاکتوکوکوس مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بهترین عمل‌کرد ایمنی در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده شد، به طوری‌که اغلب فاکتورهای ایمنی (پروتئین و هموگلوبین همولنف، فعالیت فنول‌اکسیداز و چالش با باکتری*Vibrio parahaemolyticus*) با گروه کنترل و ویتامین C اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). در بررسی برخی آنزیم‌های گوارشی، تیمار پدیوکوکوس افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($P<۰/۰۵$). تیمارهای پروبیوتیکی باعث ایجاد تغییر در فلور باکتریایی دستگاه گوارش میگوها شدند ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که لاکتوباسیلوس‌ها جزء فلور غالب دستگاه گوارش گردیدند. نتایج بافت‌شناسی روده نیز حاکی از تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بود ($P<۰/۰۵$). در حالی که مصرف این مکمل‌های غذایی باعث ایجاد اثرات چشم‌گیری در مهم‌ترین ترکیب لاشه میگو (پروتئین) نگردید ($P>۰/۰۵$). در مجموع پدیوکوکوس دارای بهترین کارایی در بین تیمارها بود.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، ویتامین C، رشد، آنزیم، ایمنی، باکتری، میگوی وانامی.

فصل اول

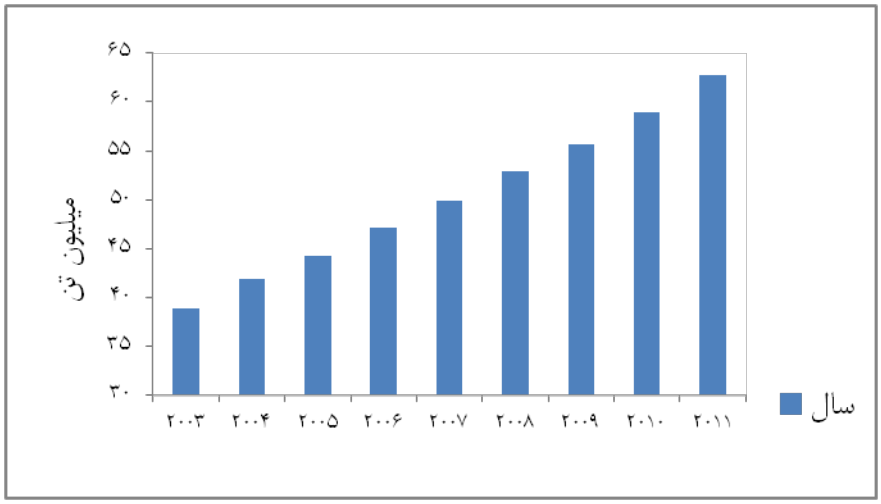
کلیات تحقیق

۱-۱- 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 این رو پیوسته محققان و پرورش‌دهندگان در پی یافتن راه‌کارهای نوین و بهتر برای تحقق هدف آبزی‌پروری هستند. آبزی‌پروری از جمله فعالیت‌های تولید غذا می‌باشد که توسعه آن مستقیماً از فشار بر روی ذخایر آبزیان دریایی و اقیانوسی کاسته و به صورت غیر مستقیم با کمک به تولید پروتئین دامی، از فشار بر روی مراتع می‌کاهد.

رشد سریع، کارایی تغذیه، عمل‌کرد رشد و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها از اهداف مهم صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود. هدف اساسی در این راستا این است که تا حد ممکن راندمان استفاده از مواد خوراکی را با به کارگیری روش‌های مدیریتی جدید مانند فرآوری مواد خوراکی، مکمل‌سازی، جایگزینی، دست‌کاری فرآیندهای هضم در دستگاه گوارش و حتی بهینه‌سازی شرایط نگهداری مواد خوراکی افزایش یابد.

پرورش آبزیان بیش از ۲۵ درصد از کل مصرف آبزی توسط انسان را تأمین می‌کند که تولید حدود ۲۲۰ گونه ماهی و آبزیان دیگر را شامل می‌شود (FAO 2013). در سطح جهانی، این صنعت از نظر تنوع گونه‌ای و افزایش تراکم و پرورش در حال گسترش است و هدف از آبزی‌پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید، برای بهینه‌سازی سودآوری می‌باشد. در نمودار ۱-۱ روند صعودی تولیدات آبزی پروری جهان بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۱ نشان داده شده است (FAO 2013). در این میان کشور چین با تولید بیش از ۳۸ میلیون تن در رتبه اول و ایران با تولید بیش از ۲۴۷ هزار تن در رتبه بیستم رده بندی قرار گرفته است.



نمودار ۱-۱: تولیدات آبزی‌پروری جهان بین سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۱۱

امروزه پرورش میگو در کشورهای در حال توسعه که دارای مناطق مناسب می‌باشند، اهمیت روز افزونی یافته و به دنبال مشکلات ناشی از بهره‌برداری بیش از حد ذخایر طبیعی آن، گام‌های مؤثری در جهت بهبود پرورش و افزایش تولید میگو برداشته شده است. قیمت مناسب این محصول در بازار جهانی و ارزآوری و سود قابل توجه آن، بسیاری از کشورها را وادار کرده که توجه بیش‌تری به این بخش داشته باشند (صالحی ۱۳۸٦، ۱۱۵).

تولید جهانی میگوی پرورشی، علیرغم 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 ۳/۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ رسیده است. تا سال ۲۰۰۰ سه گونه عمده پرورشی شامل گونه‌های میگوی ببری سیاه[1]، میگوی چینی[2] و میگوی سفید غربی[3] پیشتاز گونه‌های پرورشی بودند که ۷۸ درصد گونه‌های پرورشی دنیا را شامل می‌شدند. از سال ۲۰۰۰ گونه‌های میگوی پرورشی به یک‌باره تغییر یافت و با رویکردی نو، گونه‌های جدیدتری جایگزین گونه‌های پیشین شدند. مهم‌ترین گونه پرورشی میگو در سال‌های اخیر، میگوی وانامی بوده که در سال ۲۰۱۱ با بیش از ۲/۸ میلیون تن به رتبه پنجم گونه‌های پرورشی جهان ارتقای یافته است.

وجود ۱۸۰۰ کیلومتر سواحل جنوبی و بخشی از ۹۰۰ کیلومتر سواحل شمالی در کشور، استعداد بالقوه نسبی را برای ایجاد مزارع پرورش میگو به وجود آورده است. به طور کلی می‌توان گفت تجربیات ایران در زمینه

[1] *Penaeus monodon*
[2] *Fenneropenaeus chinensis*
[3] *Litopenaeus vannamei*

تکثیر و پرورش میگو در مقایسه با سایر کشورهای آسیای جنوب شرقی و آمریکای لاتین قابل توجه نمی‌باشد. در ابتدا تکثیر و پرورش آزمایشی انواع میگوهای بومی هم‌چون میگوی موزی[1]، میگوی ببری سبز[2]، میگوی سفید هندی[3] و میگوی سفید[4] و پرورش میگوی ببری‌سیاه[5] انجام شد که با عدم موفقیت در تکثیر یا پرورش میگوهای بومی، عدم کارایی و تولید مناسب و شیوع بیماری‌های مختلف مواجه گردید.

افزایش تقاضا و ضرورت افزایش تولید میگو از یک طرف و لزوم بالا بردن راندمان و سودآوری آن از طرف دیگر باعث گردید تا فعالان این عرصه به فکر بهره‌گیری از شیوه‌های نوین تکثیر و پرورش میگو از جمله شناسایی و معرفی گونه‌های غیر بومی[6] با قابلیت‌های مناسب به این صنعت بیفتند. این امر مستلزم وجود قابلیت سازگاری گونه جدید با شرایط محیطی جدید و بازماندگی و رشد مطلوب در آن می‌باشد. گونه وانامی با داشتن قابلیت‌های بیولوژیکی فراوان به عنوان گونه بسیار مناسب جهت بومی‌سازی در اکثر نقاط جهان از جمله در نقاط جنوبی کشور مطرح می‌باشد.

پس از بروز بحران ناشی از سرمازدگی و به دنبال آن شیوع بیماری ویروسی لکه سفید در استان خوزستان در سال ۱۳۸۱، موجب تعطیلی فعالیت‌های تولید میگو گردید. هم‌چنین بروز این بیماری در استان بوشهر در سال ۱۳۸۴، کاهش توان رقابت صادر کنندگان در بازار جهانی، افزایش هزینه‌های تولید و بازده اندک را به دنبال داشت که این واقعه زمینه‌ی توجه را به گونه‌های جدید فراهم آورد. در این راستا در سال ۱۳۸۳، ابتدا در قالب پروژه تحقیقاتی و در ادامه در سال ۱۳۸۴ در سطح تجاری میگوی وانامی به پرورش‌دهندگان معرفی شد تا به عنوان یک گونه‌ی مکمل میگوی بومی و مشروط به رعایت استانداردهای قرنطینه و امنیت زیستی، می‌تواند جایگاه مناسبی در صنعت آبزی‌پروری ایران داشته باشد (زرشناس و خلیل پذیر ۱۳۸۶، ۱۷۳).

هم اکنون این گونه به عنوان گونه‌ی اصلی مورد پرورش در استان‌های مختلف کشور (خوزستان، بوشهر، هرمزگان، سیستان و بلوچستان و گلستان) قرار گرفته و موفقیت‌های نسبتاً خوبی نیز در امر پرورش مولدین و تکثیر این گونه به دست آمده است.

۱-۲- بیان مساله

با توجه به افزایش سریع جمعیت، تأمین پروتئین از گوشت میگو منبع مهمی از رژیم پروتئین برای مصرف انسانی محسوب می‌شود. میگوی پاسفید غربی مهم‌ترین گونه سخت‌پوست پرورشی رایج در دنیا و در

[1] *Fenneropenaeus merguensis*
[2] *P. semisulcatus*
[3] *P. indicus*
[4] *Metapenaeus affinis*
[5] *P. monodon*
[6] Exotic

کشور است. رشد این گونه نسبت به سایر گونه‌های پرورشی بهتر بوده، به نحوی که آن به ۳ گرم افزایش وزن در هفته و تا وزن ۲۰ گرم در پایان دوره می‌رسد (Wyban and Sweeny 1991, 159). از دیگر قابلیت‌های این میگو، می‌توان به تراکم‌پذیری بالا و تحمل دمای پایین آب (Briggs et al 2004, 79)، دامنه تحمل شوری بسیار وسیع از ۰/۵ تا ۴۵ قسمت در هزار (Wyban and Sweeny 1991, 159)، نیاز کم‌تر به پروتئین در جیره غذایی، امکان تهیه مولدین کارآمد از میگوهای پرورشی، تهیه مولدین SPF و SPR، بالا بودن نسبت بازماندگی پست‌لاروها در مقایسه با میگوی مونودون و مقاومت نسبتاً مناسب این گونه نسبت به عوامل بیماری‌زا اشاره نمود (Briggs et al 2004, 79).

یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده آبزی‌پروری، بروز بیماری‌ها و عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا است. صنعت پرورش میگو در کشور متأثر از شرایط جهانی در سال‌های گذشته به‌علت بروز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری ویروسی لکه سفید و بیماری‌های باکتریایی متنوع دچار خسارات سنگینی شد، به گونه‌ای که از رونق گذشته خود باز ماند و دگرگون شد.

اغلب، آبزیان را برای مصونیت در برابر بیماری‌های باکتریایی، واکسیناسیون یا شیمی‌درمانی می‌کنند. هیچ کدام از این روش‌ها به طور کامل در درمان بیماری یا جلوگیری از بروز و شیوع عامل بیماری موثر نمی‌باشند. نتیجه آنتی‌بیوتیک درمانی، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم، باقی‌ماندن دارو در بافت‌های آبزی، مشکلات زیست‌محیطی است و موجب نگرانی در جوامع مختلف و بالاخص دوست‌داران محیط‌زیست شده است (Esiobu and Armenta 2002, 12; Boyd and Massaaut 1999, 20).

از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش می‌شوند که خود دارای اثرات مفیدی بر سلامتی موجود هستند. واکسن‌ها نیز بر ماهیان نابالغ بی‌تأثیر بوده، پرهزینه و استرس‌زا می‌باشند. از طرفی گستره‌ی وسیع عوامل بیماری‌زا در محیط پرورش آبزی باعث محدود شدن تأثیرات واکسن می‌شود. بنابراین نیاز به روش‌های جایگزین، به خوبی احساس می‌شود (رحمتی اندانی و دیگران ۱۳۸۹، ۲; ضیایی‌نژاد ۱۳۸۲). یکی از روش‌های ایده‌آل برای کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری، تقویت مکانیسم‌های دفاعی با اجرای اقدامات پیش‌گیرانه و تحریک کننده‌ی سیستم ایمنی است.

محرک‌های سیستم ایمنی ترکیباتی هستند که غالباً منجر به تحریک غیراختصاصی سیستم ایمنی بدن می‌شوند. انواع زیادی از ترکیبات بیولوژیکی و سنتتیکی باعث بهبود کارایی سیستم ایمنی غیراختصاصی در آبزیان پرورشی می‌شوند. معروف‌ترین محرک‌های سیستم ایمنی ترکیباتی از دیواره سلولی باکتری مانند مورامیل دی‌پپتید، کیتین، لیپوپلیساکارید، پپتیدوگلیکان و... می‌باشند. هر چند این مواد در غلظت خاص محرک ایمنی هستند، اما در مقادیر بالا باعث التهاب شدید و حتی مسمومیت شدید می‌شوند. از این رو مواد

غذایی تحریک کننده فعالیت سیستم ایمنی جدیدی با آسیب‌های جانبی کم‌تر برای کاربرد در آبزی‌پروری مورد نیاز است (Ali 2000; Amar et al 2004, 16; Clerton et al 2001, 11).

یکی از این مواد که توسط محققین مورد تائید قرار گرفته است، پروبیوتیک‌ها هستند که به عنوان عامل بیولوژیکی موثر پذیرفته شده است. در واقع مشاهده صدمات و آثار سوء حاصل از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی کننده، نگاه محققان را به پروبیوتیک‌ها جلب کرد. افزودنی‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها نوید پتانسیل و امکان جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها را در پایداری و حفظ سلامت آبزی می‌دهد (Peng et al 2005, 248). بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها با افزایش نیاز و توجه به فعالیت‌های آبزی‌پروری موافق با محیط‌زیست، به‌طوری که کم‌ترین خسارت را به محیط وارد کند، رواج یافته است (Gatesoupe 1999, 180). اگر چه به نظر می‌رسد که کاربرد پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری نسبتاً جدید باشد، علاقه‌مندی به فعالیت‌های موافق با محیط زیست باعث شده که با سرعت زیادی گسترش یابد.

پروبیوتیک‌ها، مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی را بر روی میزبان دارند (Fuller 1989, 66). هدف از به کار بردن این میکروارگانیسم‌ها در جیره، تغییر فلور باکتریایی روده به ضرر جمعیت میکروبی آسیب‌رسان به دستگاه گوارش است.

پروبیوتیک‌ها به‌وسیله‌ی 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 (Vine et al 2006, 30). مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها شامل تولید مواد ممانعت‌کننده از رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا، رقابت در جذب مواد غذایی ضروری، اشغال سطوح روده و ممانعت از استقرار عوامل بیماری‌زا، تأمین مواد غذایی ضروری و آنزیم‌های مورد نیاز میزبان و هم‌چنین تحریک بیش‌تر پاسخ‌های ایمنی می‌باشد (Marteau et al 2002, 88).

نتایج مطالعات نشان دادند که استفاده از بعضی از باکتری‌های استفاده شده به عنوان پروبیوتیک باعث ارتقای شاخص‌های رشد و فعالیت‌های آنزیمی (Kumar et al 2013, 3)، سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری (Nimrat et al 2013, 21) در میگوهای مورد بررسی شده‌اند.

ویتامین C یا L-اسید اسکوربیک، یک ماده‌ی مغذی ضروری است که برخی از پارامترهای ایمنی و مقاومت به بیماری در جانوران خشکی‌زی و آبزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اسید اسکوربیک یک ماده‌ی ضروری برای میگوهای پنائیده محسوب می‌شود. استفاده از ویتامین C در جیره‌ی غذایی باعث افزایش نرخ بازماندگی، پارامترهای رشد، هماوری و کیفیت بالای گوشت میگو می‌گردد (Racotta et al 2004, 233). علاوه بر این، نقش آن به عنوان آنتی‌اکسیدان، زدودن سموم ناشی تولید پروکسید در اثر متابولیسم بدن و به عنوان عامل ضد استرس و محرک سیستم ایمنی نیز شناخته شده است (Lee and Shiau 2002, 12).

گزارش شده است که مصرف ویتامین C باعث افزایش نرخ رشد (Manush et al 2013, 13) و برخی فعالیت‌های ایمنی در سخت‌پوستان شده است (Wang et al 2006, 12).

با توجه به اثرات سودمند مصرف مواد نام‌برده، این تحقیق به منظور بررسی امکان افزایش پاسخ‌های ایمنی، ارتقای نرخ رشد و بازماندگی میگوهای پرورشی وانامی در استان خوزستان با مصرف ویتامین C و پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس به صورت خوراکی در طی دوره‌ی سه ماهه‌ی پرورش انجام شد.

۱-۳- اهمیت و ضرورت تحقیق

شیوع بیماری‌ها به عنوان یک عامل محدود کننده در تولید و تجارت صنعت آبزی‌پروری شناخته شده است، به طوری‌که توسعه‌ی تجاری اقتصادی این بخش در بسیاری از کشورها تحت تأثیر آن قرار گرفته است. تاکنون روش‌های متداول، مثل استفاده از مواد ضدعفونی کننده و داروهای ضد میکروبی، موفقیت‌هایی در جلوگیری و یا درمان بیماری‌های آبزیان داشته‌اند (Subasinghe 1997, 45). علاوه بر این نگرانی عمیقی در خصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد.

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌ها و تحریک رشد در حیوانات، فشار انتخابی وارد شده را در جمعیت میکروبی افزایش می‌دهد و به بروز مقاومت طبیعی در باکتری‌ها کمک می‌کند. نه تنها باکتری-ها بعد از مصرف آنتی‌بیوتیک می‌توانند مقاومت نشان دهند، بلکه می‌توانند ژن‌های مقاوم را به باکتری‌های دیگری که در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها قرار نگرفته‌اند، انتقال دهند. استفاده از هر عامل ضد میکروبی شناخته شده منجر به انتخاب مقاومت تدریجی در میکروب‌ها می‌گردد که می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای برای سلامتی انسان مضر باشد. چندین روش جایگزین استفاده از ضد میکروب‌ها در کنترل بیماری پیشنهاد شده است که اخیراً به طور موفقیت‌آمیزی در پرورش آبزیان به کار گرفته می‌شود (Lunestad 1998).

بین سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰٤ مرگ و میر شدید میگوی ببری سبز به علت بیماری، منجر به تغییر در گونه اصلی پرورشی از میگوی ببری سبز به میگوی سفید غربی، گونه‌ای با ارزش از نیم‌کره غربی شده است. اگرچه اخیراً در مواردی گزارش شده است که میزان محصول میگوی وانامی به دست آمده از مزارع به دلایل مختلفی نظیر کمبود مولدین کارآمد، تغذیه و مدیریت محیطی کاهش یافته است (Valderrama and Engle 2004, 16; Alam et al 2007, 14; Boyd et al 2008, 4; Leung and Dudgeon 2008, 67).

هم‌چنین لاروهای میگو می‌توانند به آسانی توسط عفونت‌های ایجاد شده توسط پاتوژن‌های مختلف در طی دوره‌ی پرورش در استخرهای خاکی بیمار و گاهی تلف شوند (Brock and Lea Master 1992, 220; Owens et al 1998, 34; Lightner 2003, 20; Walker and Winton 2010, 41).

آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد و یا عامل درمانی از ۱۹۵۰ در آبزی‌پروری استفاده می‌شود. مصرف طولانی‌مدت از مواد نام‌برده منجر به تجمع این ماده در گوشت میگو شده که باعث بروز نگرانی‌های شدیدی شده است (Schwarz et al 2001, 17; Akinbowale et al 2006, 100). در مجموع گزارش‌های فراوانی در مورد امکان‌پذیری انتقال ژن‌های مقاوم توسط باکتری‌ها وجود دارد (Witte 2000, 16; Schwarz et al 2001, 17) که استفاده از این مواد را دچار تردید کرده است.

امروزه آبزی‌پروری براساس فناوری زیستی جدید بنا شده و استفاده از باکتری‌های زنده مفید (پروبیوتیک) رواج یافته است. اثرات بالقوه سودمند پروبیوتیک‌ها در استخرهای پرورش شامل ارتقای کیفیت آب، افزایش مواد مغذی در گونه‌های میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی مکمل، کاهش شیوع بیماری‌ها و افزایش بازماندگی و ارتقای پاسخ‌های ایمنی می‌باشد (Verschuere et al 2000, 64).

زمانی یک فعالیت اقتصادی سودآور و با ارزش است که بتوان با رعایت ملاحظات زیست‌محیطی، تولید در واحد سطح را با استفاده از روش‌هایی ایمن که ضمن حفظ سلامت محیط زیست و جاندار، دارای اثرات سوء در مصرف کننده نیز نباشد را افزایش داد.

در خصوص استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری مطالعات فراوانی صورت گرفته است. بر اساس یافته‌های محققین، پروبیوتیک‌ها با تغییر فلور باکتریایی روده، باعث افزایش ترشح آنزیم‌ها و هضم و جذب مواد غذایی شده که نتیجه آن افزایش رشد در آبزی می‌گردد. هم‌چنین با تحریک سیستم ایمنی، باعث افزایش مقاومت به عوامل نامساعد و بیماری‌زا شده که نتیجه‌ی آن ارتقای نرخ بازماندگی می‌گردد. در تحقیقات مختلف نیز استفاده از سایر مکمل‌های غذایی مانند ویتامین‌ها در جیره غذایی دارای اثرات مطلوب در افزایش رشد، بقا و تحریک سیستم ایمنی بوده است.

علیرغم آن که بسیاری از تحقیقات حاکی از تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها و برخی مکمل‌های غذایی مانند ویتامین‌ها بر شاخص‌های رشد و برخی پاسخ‌های ایمنی است، برخی محققین بر ناکارا بودن مصرف پروبیوتیک‌ها (McIntosh et al 2000, 21) و ویتامین C (Moe et al 2005, 36) در پرورش آبزیان تأکید کرده‌اند. چنین نتایج متناقضی از تأثیر پروبیوتیک‌ها و ویتامین‌ها در آبزی‌پروری، نیاز به تحقیق و بررسی بیش‌تر برای تأیید یا رد این نظرات را بر گونه‌ی مورد نظر و در شرایط پرورشی موجود، تأیید می‌کند.

با توجه به اهمیت پرورش میگو در تأمین پروتئین غذایی و ایجاد اشتغال و از طرفی اثر قابل توجه مکمل‌های غذایی بر بازده تولید، این تحقیق به منظور امکان افزایش راندمان تولید در صنعت پرورش میگوی وانامی کشور در استخرهای خاکی و در واحد تجاری انجام گردید.

۱-٤- اهداف تحقیق

با توجه به اهمیت پرورش میگوی وانامی در استان‌های جنوبی کشور و اهمیت افزایش نرخ رشد و بقا و در مجموع ارتقای راندمان تولید در واحد سطح، تحقیق حاضر با اهداف زیر انجام گردید:

۱- بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C بر پارامترهای رشد و بازماندگی میگوی وانامی
۲- بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C در افزایش میزان ترشح آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش میگوی وانامی
۳- بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C در تغییر فلور باکتریایی و مورفولوژی روده میگوی وانامی
۴- بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C بر برخی فاکتورهای سیستم ایمنی میگوی وانامی
۵- مقایسه تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C در مقاومت میگوی وانامی نسبت به چالش با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

۱-۵- فرضیه‌های تحقیق:

با توجه به اهمیت آبزی‌پروری، وجود بیماری‌های مختلف در صنعت پرورش میگو و معضلاتی که در اثر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌های قوی بوجود آمده است، استفاده از روش‌های جایگزین (مانند پروبیوتیک‌ها) که ضمن حفظ سلامت محیط زیست و مقابله با عوامل بیماری‌زا، محرک سیستم ایمنی و رشد بوده که در نهایت منجر به کارایی بهتر در تولید شود، این بررسی در مقیاس تجاری انجام شد. در مجموع بررسی حاضر بر اساس فرضیات زیر شکل گرفت:

۱- استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C دارای اثرات مثبت بر شاخص‌های رشد، بقا وکاهش ضریب تبدیل غذایی می‌باشد.
۲- استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C باعث افزایش فعالیت‌های آنزیمی در دستگاه گوارش و ارتقای وضعیت هضم و جذب در میگوی وانامی می‌شوند.
۳- پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C باعث ارتقای شاخص‌های ایمنی در میگوی وانامی می‌گردند.

٤- استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی و لاکتوکوکوس لاکتیس و ویتامین C می‌تواند باعث افزایش مقاومت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نظیر ویبریو پاراهمولیتیکوس می‌گردد.

۱-٦- تعریف واژه‌ها و اصطلاحات فنی و تخصصی (به صورت مفهومی و عملیاتی):

۱- پروبیوتیک: مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده، تأثیرات سودمندی را بر روی میزبان دارند (Fuller 1989, 66).

۲- پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی: باکتری گرم مثبت و کوکسی شکل است که اغلب به شکل جفت یا چهارتایی دیده می‌شود. به علت داشتن توانایی حضور در محدوده‌ی وسیعی از pH، دما و فشار اسمزی، می‌تواند در دستگاه گوارش کلونیزه گردد.

۳- لاکتوکوکوس لاکتیس: باکتری گرم مثبت و کوکسی شکل و غیر متحرک می‌باشد که در صورتی که گروهی باشد به شکل جفت یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده می‌شود.

۴- ویبریو پاراهمولیتیکوس: باکتری گرم منفی از خانواده Vibrionaceae که معمولاً میله‌ای شکل، متحرک، هوازی و خمیده می‌باشد. این باکتری سبب ایجاد بیماری ویبریوزیس در میگو شده که با تلفات زیادی همراه است.

فصل دوم

مروری بر سابقه تحقیق

۲-۱- مروری بر سابقه‌ی تحقیق

تاکنون بررسی‌های فراوانی در خصوص تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها و ویتامین C بر شاخص‌های رشد، فعالیت‌های آنزیمی و پاسخ‌های ایمنی آبزیان انجام شده است. به اختصار تحقیقات انجام شده در میگوهای مختلف به شرح ذیل است:

Kumar و دیگران (۲۰۱۳) اثر باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus rhamnosus* را بر الگوهای رشد میگوی وانامی (*P. vannamei*) در یک دوره‌ی ۳ هفته بررسی کردند. نتایج نشان داد که کارایی بهتر در نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، وزن به دست آمده (WG) و تعداد باکتری‌های کل به ترتیب در تیمار باسیلوس و لاکوباسیلوس نسبت به شاهد محاسبه شد.

Nimrat و دیگران (۲۰۱۳) ارتقای فاکتورهای رشد، فعالیت‌های آنزیمی و مقاومت به بیماری را در اثر ترکیبی از Enterococcus sp. و *Bacillus subtilis* بر پست‌لارو میگوی مونودون (*P. monodon*) را در یک دوره‌ی ۸۴ روزه بررسی کردند. نتایج حاکی از افزایش چشم‌گیر در میزان رشد و بازماندگی در تیمارهای حاوی باکتری نسبت به شاهد بود. میزان فعالیت آنزیم تریپسین نیز نسبت به شاهد افزایش داشته، در حالی که این روند در آنزیم کیموتریپسین مشاهده نشد. جهت بررسی ایمنی، میگوها با *Vibrio harveyi* چالش داده شده که پس از یک دوره‌ی ۱۰ روزه، میزان تلفات در تیماری که پروبیوتیک مصرف کرده بود، به طور معنی‌داری کم‌تر بود.

Sapcharoen و Rengpipat (۲۰۱۳) *B. subtilis* را بر روی فاکتورهای رشد و بازماندگی، ارتقای ایمنی و مقاومت به بیماری در میگوی وانامی (*P. vannamei*) در یک دوره‌ی ۹۰ روزه بررسی کردند. نرخ بازماندگی و رشد، تعداد هموسیت‌ها و فعالیت فنول‌اکسیداز در تیمار مصرف کننده پروبیوتیک به طور معنی‌داری بیش‌تر از شاهد بود. هم‌چنین تلفات میگوها پس از چالش با *Vibrio harveyi* به روش غوطه‌وری نیز کم‌تر بود.

Zokaeifar و دیگران (۲۰۱۲) اثر ترکیبی از دو سویه از *B. subtilis* را بر فاکتورهای رشد و بازماندگی، فعالیت آنزیمی و مقاومت به بیماری در یک دوره‌ی ۸ هفته در میگوی وانامی (*P. vannamei*) بررسی کردند. نرخ رشد ویژه (SGR) و بازماندگی به طور معنی‌داری در تیمار مصرف‌کننده پروبیوتیک بیش‌تر بود،

در حالی که ضریب تبدیل غذایی (FCR) اختلاف معنی‌داری نداشت. هم‌چنین تلفات میگوها پس از چالش با *Vibrio harveyi* کم‌تر بود.

Fernandez و دیگران (۲۰۱۱) اثر باکتری‌های اسیدلاکتیک را از طریق خوراکی بر روی فاکتورهای رشد میگوی هندی (*Fenneropenaeus indicus*) در یک دوره‌ی ۳۵ روزه بررسی کردند. نتایج نشان داد که نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، وزن به دست آمده (WG) و تعداد باکتری‌های کل در تیماری که پروبیوتیک مصرف کرده بود، نسبت به شاهد بهتر بود.

Castex و دیگران (۲۰۱۰) اثر *P. acidilactici* را بر پاسخ‌های ایمنی میگوی آبی (*Litopenaeus stylirostris*) در چالش با باکتری *Vibrio nigripulchritudo* بررسی کردند. نتایج نشان دهنده اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیک بود.

Rahiman و دیگران (۲۰۱۰) اثر Bacillus و Vibrio بر بازماندگی، فاکتورهای رشد و پاسخ‌های ایمنی میگوی روزنبرگی (*Macrobrachium rosenbergii*) بررسی نمودند. نرخ رشد ویژه (SGR)، وزن به دست آمده (WG)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، بازماندگی و کیفیت آب به طور معنی‌داری در تیمار مصرف-کننده پروبیوتیک بیش‌تر بود. پارامترهای ایمنی نیز مانند تعداد هموسیت‌های کل، فعالیت فنول‌اکسیداز و انفجار تنفسی نتایج امیدوار کننده‌ای را نشان داد.

Liu و دیگران (۲۰۰۹) *B. subtilis* را بر بازماندگی و وضعیت ایمنی لارو میگوی وانامی (*P. vannamei*) را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی، نرخ بازماندگی افزایش یافت. در پایان دوره، لاروها تحت تأثیر ناگهانی عوامل استرس مانند شوری، کاهش دما و نیتریت قرار گرفتند. نرخ مرگ و میر به طور قابل توجهی در مقایسه با شاهد کاهش داشت.

Zhang و دیگران (۲۰۰۹) اثر باکتری Halomonas sp. را بر فلور میکروبی روده، پارامترهای ایمنولوژی و ساختار هیستولوژی روده میگوی چینی (*P. chinensis*) در یک دوره‌ی ۸ هفته بررسی کردند. تعداد باکتری‌های کل در روده میگوهایی که پروبیوتیک مصرف کرده بودند، افزایش داشته، در حالی که تعداد باکتری‌های ویبریو کاهش داشتند. تعداد هموسیت‌ها و فعالیت فنول‌اکسیداز نسبت به شاهد به طور چشم‌گیری افزایش نشان داد. میگوها با ویروس لکه‌سفید (WSSV) چالش داده شده که پس از ۱۰ روز، میزان تلفات در تیماری که پروبیوتیک مصرف کرده بود، به طور معنی‌داری کم‌تر بود. استفاده از پروبیوتیک در حفظ یک‌پارچگی لایه موکوسی روده میگو مفید بوده است.

Zhou و دیگران (۲۰۰۹) *B. Coagulans* را بر کیفیت آب، نرخ بازماندگی و فعالیت‌های آنزیمی لارو میگوی وانامی (*P. vannamei*) بررسی کردند. در این بررسی، نرخ بازماندگی در تیمار مصرف کننده

پروبیوتیک افزایش یافت. فعالیت‌های پروتئاز، آلفا آمیلاز و لیپاز نیز افزایش یافتند، اما تغییر مثبتی در کیفیت آب در اثر استفاده از پروبیوتیک مشاهده نشد.

Tseng و دیگران (۲۰۰۹) ارتقای ایمنی و مقاومت نسبت به بیماری را بر اثر استفاده از *B. subtilis* در یک دوره‌ی ۹۸ روزه بر میگوی وانامی بررسی کردند. پس از چالش با *Vibrio alginolyticus* بازماندگی مناسبی از خود نشان داد. اگر چه در تعداد هموسیت‌ها و انفجار تنفسی در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی فعالیت فنول‌اکسیداز، فعالیت فاگوسیتی و قدرت باکتری‌کشی دارای اختلاف قابل توجهی با شاهد بود.

Balca´zar و دیگران (۲۰۰۷) اثر چهار سویه پروبیوتیک را بر بازماندگی پس از یک دوره‌ی ۲۸ روزه و چالش با *Vibrio parahaemolyticus* بر میگوی وانامی بررسی کردند. در این تحقیق نرخ بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی نسبت به شاهد ارتقا یافت. هم‌چنین میزان تلفات پس از چالش با *V. parahaemolyticus* به شدت کاهش داشت.

Wang (۲۰۰۷) اثر پروبیوتیک‌های فتوسنتز کننده و باسیلوس را پس از یک دوره‌ی ۲۸ روزه بر فاکتورهای رشد و فعالیت‌های آنزیمی میگوی وانامی بررسی کردند. فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، لیپاز و سلولاز دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بود. برای نرخ رشد روزانه (DWG) و نرخ وزن نسبی (RGR) نیز همین روند مشاهده شد.

Ziaei-Nejad و دیگران (۲۰۰۶) اثر پروبیوتیک تجاری باکتری‌های باسیلوس را بر فاکتورهای رشد و بازماندگی و فعالیت آنزیمی میگوی هندی بررسی کردند. تعداد باکتری‌های باسیلوس در دستگاه گوارش میگو افزایش شدیدی را نشان داد، هرچند تعداد کل باکتری‌ها چنین روندی را نشان نداد. فعالیت آنزیم‌های پروتئاز کل، آمیلاز و لیپاز دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بود. هم‌چنین نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، وزن تر و نرخ بازماندگی اندکی نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد.

Xia و دیگران (۲۰۱۳) پروبیوتیک .Arthrobacter sp را بر بازماندگی و پاسخ‌های ایمنی میگوی وانامی بررسی کردند. در این تحقیق نرخ بازماندگی، وزن میانگین میگوها، فعالیت فنول اکسیداز، فعالیت فاگوسیتوزی و قدرت باکتری‌کشی در مقایسه با شاهد دارای اختلاف قابل توجهی بود.

Gunalan و دیگران (۲۰۱۳) ارزش غذایی میگوی وانامی را بر اساس ترکیب لاشه بررسی کردند. نهایتاً به این نتیجه رسیدند که میگوی وانامی منبع بسیار مناسبی برای پروتئین و اسیدهای چرب می باشند.

Puga-López و دیگران (۲۰۱۳) ترکیب لاشه میگوی پرورشی و وحشی وانامی را مورد مقایسه قرار دادند. در این بررسی اعلام شد که اختلاف معنی‌داری بین نوع پرورشی و وحشی وجود نداشت، هرچند اندکی افزایش در میزان پروتئین و اسید چرب در میگوی وحشی به علت وجود تنوع مواد غذایی مشاهده شد.

Manush و دیگران (۲۰۱۳) اثر ویتامین C را بر فاکتورهای رشد میگوی روزنبرگی بررسی کردند. در این تحقیق میانگین وزن، نرخ بازماندگی و فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز دارای اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد بود.
Darvishpour و دیگران (۲۰۱۲) اثر ویتامین‌های مختلف را بر رشد و بازماندگی میگوی وانامی بررسی کردند. در این تحقیق، نرخ رشد ویژه (SGR) و بازماندگی در تیمار ویتامین C در مقایسه با شاهد بیش‌تر، ولی در مقایسه با تیمار ویتامین ای دارای اثرات مثبت کم‌تری بود. هم‌چنین در مواجهه با استرس شوری، ویتامین ای، سپس ویتامین C دارای بقا بیش‌تری در مقایسه با شاهد بودند.
Wang و دیگران (۲۰۰۶) غذای میگوی وانامی را با ویتامین C غنی نموده و پاسخ‌های سیستم ایمنی را در برابر سطوح مختلف آمونیاک بررسی کردند. نتایج نشان داد که این عمل به علت کاهش اثر سمیت آمونیاک، باعث ارتقای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میگو و افزایش سیستم دفاعی در زمان مواجهه با استرس‌های محیطی گردید.
Javadi و دیگران (۲۰۱۱) اثر پروبیوتیک تجاری را بر فاکتورهای رشد و بازماندگی را در دوره‌ی پرورش میگوی وانامی بررسی نمودند که اثرات مثبتی را در نرخ رشد و بازماندگی در مقایسه با تیمار شاهد گزارش نمودند.
Lee و Shiau (۲۰۰۲) ترکیب ویتامین C را در غذای میگوی مونودون قرار داده و پاسخ‌های ایمنی میگوی مونودون را بررسی نمودند. ایشان مشاهده کردند که مصرف ویتامین C در سطوح مختلف باعث افزایش سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری گردید.
McIntosh و دیگران (۲۰۰۰) پروبیوتیکی که حاوی مخلوطی از باسیلوس بود را به میگوی وانامی تأثیر داد و گزارش کردند که تأثیر معنی‌داری بر روی بازماندگی این میگو ندارد.
Alavandi و دیگران (۲۰۰٤) اثر باکتری‌های .Pseudomonas sp و *Vibrio fluvialis* را بر شاخص‌های ایمنی میگوی مونودون بررسی نمودند. تعداد هموسیت‌ها، فعالیت فنول‌اکسیداز و فعالیت آنتی‌باکتریال مورد مطالعه قرار گرفته که در تیمارهای نام‌برده نسبت به شاهد دارای نتایج بهتری بود.
Vieira و دیگران (۲۰۱۰) باکتری *Lactobacillus plantarum* را وارد جیره غذایی میگوی وانامی نموده و نرخ بقا را پس از چالش با *Vibrio harveyi* مورد بررسی قرار دادند. هیچ اختلاف معنی‌داری در نرخ بازماندگی و رشد در تیمارهای مختلف ثبت نشد. تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های ویبریو تا روز چهلم آزماش، اختلاف فاحشی نداشته، اما در روز شصت آزمایش کمی کاهش یافت. باکتری‌های اسید لاکتیک نیز پس از روز بیستم در دستگاه گوارش میگو افزایش یافتند. پس از چالش با *Vibrio harveyi* میگوهایی که پرویبوتیک مصرف کرده بودند، تلفات کم‌تری را نشات دادند. تغییر فلور باکتریایی روده میگو، علت افزایش بازماندگی میگوها پس از چالش اعلام شد.

۲-۲- معرفی گونه میگوی سفید غربی

۲-۲-۱ طبقه‌بندی: میگوی پا سفید غربی با نام علمی *Litopenaeus vannamei* جزء خانوداه پنائیده (Penaeidae) بوده و به قرار زیر رده‌بندی می‌گردد (Tamayo 2006, 41):

جدول ۲-۱: رده بندی میگوی وانامی

kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea (Brunnich, 1772)
Class	Malacostraca (Latreille,1802)
Subclass	Eumalacostra (Grobben, 1892)
Order	Decapoda (Latrilla, 1802)
Suborder	Dendrobranchiata (Bata, 1888)
Superfamily	Penaeoidea (Refinesque, 1815)
Family	Penaeidae (Refinesque, 1815)
Genus	*Litopenaeus* (Perez-Farfante, 1969)
Species	*L. vannamei* (Boone, 1931)

این گونه در منابع قدیمی‌تر دارای نام علمی *Penaeus vannamei* بود و به نام‌های معمولی West coast shrimp white، Comaron blanco, Langostino و هم‌چنین در منابع فائو با نام‌های White leg shrimp، Crevette patlesblanches و Pacific white shrimp شناخته می‌شود.

۲-۲-۲ بیولوژی میگوی وانامی

میگوهای خانواده پنائیده از لحاظ ظاهری مشابه افراد رده‌ی سخت‌پوستان پست[1] می‌باشند. بدن از دو طرف فشرده و شکمی کاملاً توسعه یافته برای شنا کردن دارند. رنگ بدن سفید ناشفاف (مات) است، از این رو آن را اغلب با نام "میگوی سفید" یا "میگوی پا سفید" می‌شناسند، البته بسته به بستر، غذا و رنگ آب می‌تواند تغییر رنگ دهد. بدن این میگو اغلب نمای آبی رنگ دارد که به دلیل تمرکز کروماتوفورهای آبی در لبه‌های کاراپاس و تلسون می‌باشد (Eldered and Hutton 1960, 23).

[1] Malacostraca

میگوی ماده بالغ وانامی از انواع میگوهای تلیکوم باز بوده، لذا وادار کردن آن‌ها به جفت‌گیری و تخم‌ریزی در شرایط اسارت آسان‌تر بوده و این امکان را فراهم می‌سازد که چرخه‌ی زندگی این میگو در شرایط اسارت کامل شود (افشارنسب و دیگران ۱۳۸۷، ۳). پتاسما در نرهای بالغ قرینه‌دار و نیمه‌باز می‌باشد. کمپلکس اسپرماتوفورها عبارت است از توده‌ی اسپرم‌هایی که توسط غلافی به صورت کپسول درآمده است. در بسترهای گلی و تا عمق ۷۲ متری یافت می‌شود و در شمار میگوهای حفار یا خزنده[1] می‌باشد. این میگو تا حدود ۲۳۰ میلی‌متر رشد می‌کند و بیش‌ترین اندازه کاراپاس به ۹۰ میلی‌متر می‌رسد.

ماده‌ها معمولاً سریع‌تر از نرها رشد می‌کنند و جثه‌ی آن‌ها بزرگ‌تر می‌باشد. روستروم در میگوی سفید غربی اندازه‌ی متوسط دارد، در جوان‌ترها نسبت به بدن بلندتر بوده و از آنتن‌ها جلوتر افتاده است، در حالی که در بالغ‌ها نسبت به بدن از طول کم‌تری برخوردار بوده و تقریباً به نصف قطعه دوم آنتن می‌رسد. بر روی لبه‌ی پایینی روستروم ٤-۲ دندانه و بر روی لبه‌ی بالایی آن ۱۰-۷ عدد دندانه دارد (Tamayo 2006, 41).

چرخه‌ی زندگی این میگو شامل یک مرحله‌ی لاروی پلانکتونی (شامل ٦ مرحله ناپلی، ۳ مرحله پروتوزوآ و ۳ مرحله مایسیس) در اقیانوس، یک مرحله‌ی پست‌لارو تا جوان در مصب و سپس بازگشت به محیط زیست دریایی به عنوان یک جانور بالغ که تا رسیدن به مرحله رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی در آن‌جاست (Kitani 1986, 25).

بالغ‌ها در اقیانوس‌های باز زندگی و تخم‌ریزی می‌کنند. پس از تخم‌ریزی، پست‌لاروها به آب‌های نزدیک ساحل و مصب، تالاب‌ها و یا نواحی مانگرویی که سرشار از مواد غذایی است و شوری پایین دارد، مهاجرت می‌کنند. آن‌جا رشد کرده و سرانجام بالغ‌ها به آب‌های باز اقیانوسی برمی‌گردند. بالغ‌ها به آب‌های باز دریایی سازگارند، ابتدا زندگی کف‌زی روی بستر دریا را شروع می‌کنند تا رسیدگی جنسی کامل شود. تولید تخم توسط ماده‌ها وابسته به اندازه انفرادی (با وزن ۳۰ تا ۴۵ گرم) می‌باشد که میزان تخم‌ریزی بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ هزار تخم با قطر تقریباً ۰/۲۲ میلی‌متر می‌باشد (Tamayo 2006, 41).

۲-۲-۳ پراکنش میگوی وانامی

زیستگاه اصلی میگوی سفید غربی، در سواحل غربی اقیانوس آرام واقع در کشورهای آمریکای لاتین از پرو در جنوب تا مکزیک در شمال، در مناطقی که دمای آب به صورت طبیعی در تمام مدت سال بالاتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد است، می‌باشد (Tamayo 2006, 41).

این گونه در اوایل دهه ۱۹۷۰ به جزایر اقیانوس آرام معرفی شد که در آن‌جا تحقیقات زیادی پیرامون قابلیت تکثیر و پرورش آن‌ها صورت گرفت. میگوی سفید غربی در اواخر دهه ۱۹۷۰ تا اوایل ۱۹۸۰ به هاوایی و

[1] Burrowing shrimp

سواحل شرقی اقیانوس اطلس از کارولینای جنوبی و تگزاس در شمال و آمریکای جنوبی تا جنوب برزیل معرفی شد (افشارنسب و دیگران ۱۳۸۷، ۳).

۲-۲-۴ مزیت‌های پرورشی میگوی وانامی

گونه نام‌برده از بسیاری جهات نسبت به گونه‌های دیگر پرورشی برتری دارد که به اختصار به شرح ذیل است:

۱- سرعت رشد

این گونه رشد مناسبی دارد و در شرایط تجاری در استخرهای خاکی آسیا و در شرایط متراکم، سرعت رشد و بازماندگی مناسبی دارد (زرشناس و پذیر ۱۳۸۶، ۲۷). سرعت رشد گونه‌ی مورد نظر معادل میگوی ببری سیاه است و می‌تواند تا ۳ گرم در هفته رشد نماید.

۲- تراکم ذخیره‌سازی

پرورش میگوی وانامی در تراکم‌های بسیار بالا در مترمکعب امکان‌پذیر است. در نتیجه باعث افزایش تولید در واحد سطح و بهره‌وری بهتر می‌شود.

۳- دامنه تحمل شوری

میگوی مورد نظر دامنه وسیعی از درجات شوری از صفر تا ۵۰ قسمت در هزار را تحمل می‌کند و در محدوده‌ی شوری ۱۵-۱۰ قسمت در هزار بهترین رشد را دارد. بهترین شوری برای پرورش این گونه در شرایط ایران ۳۰-۱۵ قسمت در هزار گزارش شده است (عسکری‌ساری و دیگران ۱۳۸۷، ۱).

۴- دامنه تحمل دما

گرچه میگوی وانامی می‌تواند دامنه وسیعی از دما را تحمل نماید، اما همانند اغلب گونه‌های دیگر استوایی و نیمه‌استوایی، بهترین رشد را در دمای ۳۰-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد دارد. مناسب‌ترین درجه حرارت رشد این گونه در وزن‌های کم (یک گرمی)، ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای میگوهای بزرگ‌تر (۱۸-۱۲ گرمی)، ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد است. این میگو دمای ۳۳-۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد را بدون هیچ مشکلی تحمل می‌نماید، اما از رشد آن کاسته می‌شود. بنابراین پرورش این گونه در فصول سرد نیز اقتصادی خواهد بود (زرشناس و پذیر ۱۳۸۶، ۲۷).

۵- میزان نیاز به پروتئین در جیره غذایی

در مقایسه با میگوی ببری سیاه، میگوی چینی یا میگوی آبی که نیاز پروتئینی آن‌ها ۴۲-۳۶ درصد است، میگوی وانامی به غذای با پروتئین کم‌تر (۳۵-۲۰ درصد) جواب داده، در نتیجه غذای آن ارزان‌تر است. هم‌چنین می‌توان آن را با منابع پروتئین گیاهی به خوبی پرورش داده (Ray et al 2010, 299) و به‌طور مشخص از پروتئین سویا (غفله‌مرمضی و دیگران ۱۳۸۹، ۳۷) تأمین کرد و بدین صورت از هزینه‌ی تولید غذای میگو (و در نتیجه از هزینه‌ی تولید میگو) کاست، زیرا بیش از ۶۰ درصد از هزینه‌های تولید در مزارع پرورش میگو، مربوط به غذا می‌باشد.

۶- سهولت تکثیر و اهلی‌سازی

برخلاف میگوی ببری سیاه که دارای تلیکوم بسته است، میگوی سفید غربی دارای تلیکوم باز است. از این رو وادار کردن آن‌ها به جفت‌گیری و تخم‌ریزی در شرایط اسارت آسان‌تر است.

۷- پرورش لارو

میزان بازماندگی لارو میگوی سفید غربی در مراکز تکثیر معمولاً ۶۰-۵۰ درصد است که از میگوی ببری سیاه (۳۰-۲۰ درصد) بیش‌تر است.

۸- مقامت به بیماری‌ها

به طورکلی میگوی وانامی در مقایسه با سایر گونه‌ها نسبت به بیماری‌ها مقاوم‌تر است، اما در مقابل بیماری لکه‌سفید و تائورا که موجب مرگ و میر شدید می‌شوند، به شدت آسیب‌پذیر و ناقل بیماری IHHN نیز می‌باشد. به دلیل مقاومت نسبی به بیماری‌ها این گونه در چین جایگزین میگوی چینی گردیده است که مقاومت کم‌تری در مقابل بیماری‌های ویروسی دارد.

۹- امکان تولید مولدین عاری از بیماری‌های خاص و مقاوم به بیماری

امکان تولید میگوی SPF یا عاری از عامل بیماری‌های خاص و SPR یا مقاوم به بیماری در گونه‌ی سفید غربی وجود دارد. در حقیقت دسترسی به فن‌آوری تولید SPF و SPR در این گونه یکی از مهم‌ترین دلایل گسترش آن بوده است.

۲-۳- مروری بر سیستم ایمنی میگوها

سخت‌پوستان مانند ماهی‌ها در محیط‌های آب شیرین و دریایی زندگی می‌کنند که غنی از میکروارگانیسم‌ها و انگل‌ها است، بنابراین باید سیستم دفاعی مناسبی داشته باشند تا بتوانند خود را در مقابل پاتوژن‌ها حفظ کنند. اگرچه سخت‌پوستان به علت داشتن پوسته‌ی کوتیکول از نفوذ تعداد زیادی از ارگانیسم‌ها و انگل‌ها به داخل بدن خود جلوگیری می‌کنند، ولی این سیستم برای دفاع کافی نیست و باید واجد یک سیستم دفاعی داخلی نیز باشند که می‌توان از آن تحت عنوان شبکه دفاع ایمنی داخلی[1] نام برد.

مقاومت میگو در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم تا حد زیادی ناشی از شرایط ایمنی است که موجود در آن قرار دارد. از طرفی مکانیسم دفاعی سخت‌پوستان نسبت به ماهیان باله‌دار[2] و سایر مهره‌داران از بلوغ کم‌تری برخوردار است. به بیان دیگر، سخت‌پوستان فاقد حافظه ایمنی هستند. درک سیستم دفاعی میگوها به بهبود مدیریت بیماری و درمان این موجودات منجر خواهد شد.

سیستم خونی در این جانوران نقش مهمی در دفاع دارد، زیرا این جانوران دارای گردش خون باز هستند که آن را هموکول می‌گویند، به طوری که واجد یک قلب ساده و تعدادی سرخ‌رگ بوده و خون در یک بستر بازی قرار می‌گیرد تا در تبادل گازی و در بافت‌ها صورت گیرد، زیرا این جانوران فاقد سیاه‌رگ هستند. بنابراین در صورت ایجاد زخم اگر سیستم انعقادی مناسبی نداشته باشند، ابتدا میزان زیادی از همولنف را از دست داده، سپس میکروارگانیسم‌ها به راحتی می‌توانند به اندام‌ها و بافت‌های داخلی آن‌ها نفوذ کنند. بنابراین واکنش‌های انعقادی در این جانوران واکنش‌های سریع می‌باشند.

در سخت‌پوستان رویدادی به نام نقص ایمنی یا تحمل ایمنی[3] وجود دارد. به طور کلی وقتی یک جانور در تهاجم یک پاتوژن قرار می‌گیرد، ممکن است حالات متفاوتی پیش آید: ۱- میزبان با پاتوژن غلبه کرده و آن را حذف می‌کند ۲- پاتوژن به میزبان غلبه کرده و موجب مرگ میزبان می‌شود ۳- میزبان نقش حامل را پیدا کرده و پاتوژن را به عنوان جزء خودی می‌پذیرد. حالت سوم یعنی ورود پاتوژن به بدن میزبان و عدم واکنش ایمنی میزبان به آن، در سخت‌پوستان مشاهده شده است (سلطانی ۱۳۸٦، ۲۲۵).

[1] Internal immune defense network
[2] Finfish
[3] Immune tolerance

۲-۳-۱ مکانیسم‌های دفاعی در سخت‌پوستان

سازوکار دفاعی در سخت‌پوستان شامل مقاومت ذاتی یا طبیعی[1] و مقاومت یا ایمنی اکتسابی[2] است. مقاومت ذاتی بر پایه پاسخ‌های میزبانی است که در اولین برخورد با پاتوژن از خود نشان می‌دهند و اغلب به ویژگی‌های گونه‌ای یا اجدادی بستگی دارد. مقاومت اکتسابی شامل پاسخ‌هایی است که به دنبال برخورد ابتدایی با یک پاتوژن مهاجم یا آنتی‌ژن و مواد متابولیتی درون بدن بروز می‌کند. اطلاعات به دست آمده از سلول‌های ایمنی جهت فعالیت سیستم‌های ایمنی سلولی و هومورال نشان می‌دهد که پس از ورود پاتوژن این سیستم با تولید عوامل خاصی بلافاصله پاسخ می‌دهند. سپس عوامل تولیدی توسط سیستم ایمنی قادر به حذف پاتوژن یا ذره‌ی خارجی خواهند بود. سیستم ایمنی این برخورد و رویارویی با پاتوژن را به خاطر سپرده، بنابراین در برخورد دوباره با پاتوژن پاسخ‌های مناسب‌تر و سریع‌تری نشان می‌دهد (سلطانی ۱۳۸٦، ۲۲٦).

ساز و کار دفاعی در سخت‌پوستان، چه ذاتی یا اکتسابی، شامل مکانیسم‌های ایمنی سلولی[3] و ایمنی خونی[4] است. پاسخ‌های ایمنی سلولی در سخت‌پوستان شامل فعالیت و عمل‌کرد انواع مختلف سلول‌های موجود در همولنف سخت‌پوستان است. پاسخ‌های خونی در واقع نوعی از پاسخ‌های سلولی بوده که با ترشحات سلولی با خواص باکتری‌کشی و جلوگیری از رشد باکتری‌ها همراه خواهند بود. هر دو سازوکار دفاعی خونی و سلولی در یک سری فعالیت‌های هماهنگ و هم‌زمان موجب حذف پاتوژن‌های مهاجم می‌شوند.

۲-۳-۲ سلول‌های خونی (هموسیت‌ها) و وظایف آن‌ها

سیستم گردش خون در سخت‌پوستان را هموکول[5] و خون آن‌ها را همولنف[6] می‌گویند. هموسیت‌ها به طور پیوسته در میزان‌های مختلف از بافت‌های اختصاصی، آزاد و رها می‌شوند. هموسیت‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی میزبان بازی می‌کنند که از آن جمله می‌توان به شناسایی اجرام بیماری‌زا، فاگوسیتوز، تولید ملانین و مسمومیت سلولی اشاره کرد. این سلول‌ها شامل سلول‌های هیالینه[7] (بدون گرانول)، سلول‌های نیمه‌گرانولار[8] و سلول‌های گرانولار[9] هستند. این هموسیت‌ها اغلب به طور دائم با هموسیت‌های جدید در

[1] Innate
[2] Aquired
[3] Cellular
[4] Humoral
[5] haemocoel
[6] haemolymph
[7] hyalocytes
[8] semigranulocytes
[9] Granolocytes

همولنف جایگزی می‌شوند. تعداد هموسیت‌ها در گونه‌های مختلف سخت‌پوستان و با توجه به ویژگی‌های فردی موجود و شرایط مختلفی که گونه‌ای از سخت‌پوستان در آن قرار دارند، متفاوت خواهد بود.

۲-۳-۲-۱ سلول‌های هیالینه (هیالونوسیت‌ها)

هیالونوسیت‌ها کوچک‌ترین و کم‌ترین سلول‌ها در میان انواع هموسیت‌های موجود در همولنف اغلب سخت‌پوستان بوده و به عنوان سلول‌های فاگوسیتوز کننده معرفی شده‌اند. این سلول‌ها از قدرت چسبندگی بالایی برخوردار بوده و سلول‌های مهمی در عمل فاگوسیتوز و نابودی اجرام خارجی یا پاتوژن‌های مهاجم محسوب می‌شوند. در عمل تشکیل کپسول و سیستم فعال‌کنندهٔ پروفنل اکسیداز[1] نقشی ندارند.

۲-۳-۲-۲ سلول‌های نیمه‌گرانولار

سلول‌های بسیار ناپایداری هستند. این سلول‌ها در شناسایی آنتی‌ژن‌های خارجی از روش رهاسازی محتویات گرانول‌های خود و چسبیدن و پخش‌شدن روی سطح آنتی‌ژن‌ها نقش دارند. تنها سلول‌هایی هستند که با لیپوپلی‌ساکاریدهای میکروبی و ترکیبات گلوکانی ترکیب و فعال می‌شوند (از راه گیرنده‌های اختصاصی روی سطح خود). این سلول‌ها در فاگوسیتوز نقش محدودی دارند، ولی در عمل تشکیل کپسول بسیار فعال هستند. به علاوه در اعمال مسمومیت سلولی و سیستم فعال‌کننده‌ی فنول‌اکسیداز هم نقش دارند.

۲-۳-۲-۳ سلول‌های گرانولار

این سلول‌ها واجد گرانول‌هایی در سیتوپلاسم خود بوده و از نظر ابعاد بزرگ‌ترین نوع هموسیت هستند. در فاگوسیتوز نقشی نداشته و در واکنش‌های تشکیل کپسول و ندول نقش محدودی دارند. در مسمومیت سلولی فعالند و عمده‌ی نقش آن‌ها در فعال کردن سیستم فعال‌کننده‌ی فنول‌اکسیداز است و برخلاف سلول‌های نیمه‌گرانولار در شرایط آزمایشگاهی پایدارند.

۲-۳-۳ انواع پاسخ‌های دفاعی و ایمنی در سخت‌پوستان و سازوکارهای درگیر

به طور کلی می‌توان پاسخ‌های دفاعی و ایمنی این جانوران را در سه دسته طبقه‌بندی کرد که عبارتند از:

۱- پاسخ‌های فیزیکوشیمیایی (شامل پوسته و پوست)؛

[1] Pro activating system

۲- ایمنی سلولی شامل: فاگوسیتوز؛ تشکیل ندول؛ ایجاد کپسول در اطراف انگل‌ها و اجرام بیماری‌زایی که قابل فاگوسیتوز نیستند؛ مسمومیت سلولی و واکنش‌های تشکیل انعقاد؛
۳- ایمنی خونی (مایعی) شامل سیستم پروفنول اکسیداز (سلطانی ۱۳۸٦، ۲۲۷).

پوسته (کوتیکول) و پوست نقش مهمی در دفاع از جانوران سخت‌پوست بازی می‌کنند. ساختمان کوتیکول در میگو شامل سه لایهٔ خارجی[1]، لایهٔ میانی[2] و لایهٔ داخلی[3] است. لایهٔ خارجی سرشار از ترکیبات فسفات کلسیم و کربنات کلسیم می‌باشد. در لایهٔ میانی بر میزان این ترکیبات کلسیمی افزوده شده و در لایه داخی کاملاً متراکم شده و شکل کیتینی و غیرکلیسیفیه شده‌ای به خود می‌گیرند. طبیعی است که وجود چنین پوسته‌ای بر روی پوست میگو، مانع فیزیکی خوبی برای جلوگیری از تثبیت و نفوذ میکروارگانیسم‌ها در روی پوست و اندام‌های داخلی‌تر است. به علاوه کوتیکول حاوی ترشحات مومی خواهد بود که عدم وجود این ترشحات منجر به نفوذپذیری کوتیکول به آب و گازها می‌شود.

۲-۳-٤ ایمنی سلولی

۲-۳-٤-۱ فاگوسیتوز

مکانیسم دفاعی فاگوسیتوز متداول‌ترین واکنش دفاع سلولی پس از موانع فیزیکوشیمیایی در سخت‌پوستان محسوب می‌شود. سلول‌های هیالین و تا حدی سمی‌گرانولوسیت‌ها در این عمل درگیرند.
کارایی و اثر عمل فاگوسیتوز در نابودی میکروارگانیسم‌ها بسته به نوع میکروارگانیسم‌ها، شرایط محیطی و فیزیولوژیکی متفاوت می‌باشد. فاگوسیت‌ها می‌توانند در محل عفونت یا جراحت بافت‌ها، تصفیه‌کننده‌ی سیستم گردش باشند و با این عمل از گسترش اجرام خارجی و پاتوژن در مایعات بدن جلوگیری کنند. نتیجه‌ی نهایی فاگوسیتوز نابودی میکروارگانیسم‌های مهاجم توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده و تشکیل ندول است.

۲-۳-٤-۲ تشکیل ندول[4]

هنگامی که تعداد زیادی پاتوژن وارد بدن میزبان می‌شود، بخشی از آن‌ها توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده فاگوسیتوز می‌شوند، اما تعدادی از این پاتوژن‌ها باقی‌مانده که در این صورت میزبان با تشکیل حصارهایی از

[1] epicuticule
[2] exocuticule
[3] endocuticule
[4] Nodule formation

هموسل‌ها (هموسیت‌ها)، در اطراف این آنتی‌ژن‌ها آن‌ها را به دام انداخته که حاصل آن تشکیل یک حالت ندولی شکل است و با این راه از تکثیر و انتشار پاتوژن‌ها به سایر اندام‌ها جلوگیری می‌شود.

۲-۳-٤-۳ تشکیل کپسول

هنگامی که اندازه‌ی جرم خارجی یا پاتوژن مهاجم مانند انگل‌ها بسیار بزرگ باشد، قابل فاگوسیتوز نبوده و توسط سلول‌های نیمه‌گرانولار محاصره می‌شود. سمی‌گرانولوسیت‌ها در این عمل نقش مهمی دارند، ولی گرانولوسیت‌ها و هیالونوسیت‌ها درگیر نیستند.

۲-۳-۵ ایمنی مایعی

پاسخ‌های ایمنی اختصاصی توسط مواد شبه‌ایمنوگلوبولینی که در ماهی‌ها و سایر مهره‌داران شناسایی شده‌اند، در سخت‌پوستان نیز وجود دارند. به عبارت دیگر سخت‌پوستان واجد مواد شبه آنتی‌بادی طبیعی مشابه آگلوتنین‌ها، پرسیپیتین‌ها، باکتریسیدین‌ها، لیزین‌ها و همولیزین‌های ناپایدار در برابر گرما هستند که دارای ویژگی‌ها و خاصیت ضدمیکروبی مهمی در پاسخ به هجوم پاتوژن‌ها هستند. همولیزین‌های طبیعی با خاصیت لیزکنندگی اریتروسیت‌های گوسفندی در همولنف سخت‌پوستان شناسایی شده‌اند. فعالیت همولیزینی در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد طی چند ثانیه از بین می‌رود. علاوه بر این‌ها در سخت‌پوستان مانند میگو و خرچنگ‌ها مشخص شده است که هموسیت‌های گرانولار حاوی پپتیدهای ضدمیکروبی هستند که مسئول دفاع میزبان در برابر پاتوژن‌های میکروبی خواهند بود. تولید پپتیدهای ضدمیکروبی به عنوان اولین سد دفاعی میزبان در ایمنی ذاتی معرفی شده است.

۲-۳-۵-۱ لکتین‌ها

لکتین‌ها یا هماگلوتین‌ها در ماهیان موجب تحریک لنفوسیت‌ها (سخت‌پوستان لنفوسیت ندارند)، عمل آگلوتیناسیون، هماگلویتاسیون و فاگوسیتوز می‌شوند. از جمله ترکیبات گلیکوپروتئین مانند تاکی‌لکتین[1] هستند که در همولنف وجود دارند و در این جانوران به عنوان یکی از عوامل شیمیایی پاتوژن‌ها هستند. به علاوه خاصیت اپسونین هم دارند که از این راه موجب تحریک عمل فاگوسیتوز شده و در چسباندن فاگوسیت‌ها به آنتی‌ژن‌ها عمل می‌کنند.

[1] Tachy Lectin

این عمل را از راه نقش واسطه یعنی چسبیدن به سطوح هموسیت‌ها و تحریک آن‌ها برای چسبیدن به آنتی‌ژن‌ها انجام می‌دهند. پروتئین‌های شبیه به لکتین‌ها را در میگوی مونودون شناسایی کرده‌اند. لکتین‌ها مولکول‌های شناساگرند که در تشخیص عامل غیرخودی در سازوکار دفاعی ایفای نقش می‌کنند و به این راه سبب حفاظت موجود در برابر عفونت می‌شوند. اغلب لکتین‌ها در سخت‌پوستان از نوع اسیدسیالیک خاص هستند. به علاوه هموسیت‌ها و همولنف نیز حاوی لیزوزیم‌ها و آنزیم‌های دیگر مثل بتا گلوکورونیدازها، اسید فسفاتازها، آلکالین فسفاتازها، لیپازها و غیره‌اند که همه این‌ها بر روی پاتوژن‌ها موثرند.

۲-۳-۵-۲ لیزوزیم

لیزوزیم یک آنزیم موکولیتیک با منشاء لکوسیتی است که خاصیت دفاعی در برابر تهاجم میکروب‌ها دارد. لیزوزیم در سیستم ایمنی ذاتی بی‌مهرگان جزء پپتیدهای ضدباکتری طبقه‌بندی شده است. این مولکول قادر به هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی پپتیدوگلیکان‌های دیوارهٔ باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های گرم‌مثبت است. لیزوزیم نیز به علت دسترسی به پپتیدوگلیکان غشاء، به‌طور موثری فعالیت می‌نماید. علاوه بر عملکرد ضد باکتریایی، این آنزیم باعث افزایش بیگانه‌خواری توسط سلول‌های بیگانه‌خوار، به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم به وسیله اثر اپسونین‌ها[1]) می‌گردد. این آنزیم هم‌چنین به ساختارهای حاوی مورامیک اسید حمله کرده و گلیکوکیتین را هیدرولیز می‌نماید. لیزوزیم اثر تخریبی محدودی نیز روی کیتین (یک پلیمر خطی از ان استیلگلوکوزامین) که جزء مهمی از دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی بعضی بی‌مهرگان است، دارد. حداکثر فعالیت لیزوزیم در pH حدود ۷-٦ می‌باشد.

فعالیت لیزوزیم در سیستم ایمنی سخت‌پوستان تنها در گونه‌های معدودی از خرچنگ‌های دراز آب شیرین و در میگوی وانامی و آرتمیا[2] گزارش شده است (Sotelo et al 2003, 15).

عوامل محیطی نظیر درجه حرارت، میزان شوری آب، اکسیژن محلول، مواد غذایی، وجود عوامل آلوده‌کننده می‌توانند روی فعالیت لیزوزیم تاثیر بگذارند. لیزوزیم می‌تواند سلول میکروکوکوس لیزودایکتیکوس[3] را لیز نماید و در pH اسیدی و دماهای بالا پایدار بوده و در شرایط قلیایی غیرفعال می‌گردد.

عامل مهم سازوکار ایمنی وجود خاطره‌ی ایمنولوژیکی است که سبب غنی‌سازی و تقویت سیستم ایمنی بعد از رویارویی اولیه با پاتوژن یا آنتی‌ژن مشابه می‌شود. این سازوکار غنی‌سازی سیستم ایمنی به عنوان یک پاسخ ذاتی و ارثی خواهد بود و در نتیجه حضور سلول‌های خاطره‌ای ایمنولوژیکی اتفاق می‌افتد. به هرحال این سازوکار در سخت‌پوستان مانند مهره‌داران پیشرفته نبوده و اطلاعات اندکی در این زمینه وجود دارد.

---

[1] Epsonin
[2] *Artemia franciscana*
[3] *Micrococcus lysodeikticus*

۲-۳-۵-۳ سیستم فعال‌کننده‌ی پروآنزیم پروفنل‌اکسیداز

این سیستم عبارتست از یک پروآنزیم (پروفنول‌اکسیداز) که با یک سری واکنش‌های آنزیمی فعال شده و تبدیل به فنول‌اکسیداز شده، سپس با مشارکت در واکنش تشکیل کپسول، نقش دفاعی خود را اعمال می‌کند. آنزیم فنول‌اکسیداز نیز مسئول واکنش ملانینی شدن است و این واکنش اغلب به عنوان یک پاسخی به عوامل بیماری‌زا خواهد بود که وارد حفرهٔ بدنی سخت‌پوستان و حشرات می‌شوند. به طور خلاصه نحوه‌ی عمل سیستم (آنزیم) به گونه‌ای است که ابتدا ترکیبات پلی‌ساکاریدی، گلیکوپروتئینی و یا گلوکان‌های باکتری‌ها و قارچ‌ها با پروتئین ویژه‌ای به نام پروتئین شناساگر در همولنف ترکیب شده و سیستم را فعال می‌کند. بنابراین متوجه شده‌اند که این سیستم به عنوان یک عامل شناسایی و دفاعی در سخت‌پوستان عمل می‌کند. البته راه دیگر فعال‌کردن سیستم این است که این ترکیبات آنتی‌ژنی مستقیم و بدون باند شدن با این پروتئین شناساگر موجب فعال شدن سمی‌گرانولوسیت‌ها شده، به طوری که این سلول‌ها دگرانوله شده و پروآنزیم (پروفنل اکسیداز) را ترشح می‌کنند. پروتئین شناساگر موجود در همولنف با این پروتئین‌های آنتی‌ژنی ترکیب و تشکیل یک ترکیب کمپلکس می‌دهد که توسط گیرنده‌های گرانولوسیتی شناسایی و پس از باندشدن با آن، موجب فعال‌شدن این سلول‌ها می‌شود. با فعال‌شدن گرانولوسیت‌ها، این سلول‌ها دگرانوله شده و پروآنزیم (پروفنول‌اکسیداز) را ترشح می‌کنند. راه سوم فعال شدن سیستم این است که این ترکیبات آنتی‌ژنی به طور مستقیم موجب فعال شدن پروآنزیم موجود در همولنف می‌شوند. با فعال شدن پروآنزیم، تبدیل به آنزیم فنول‌اکسیداز شده که عبارت از یک آنزیم فعال است و روی پروتئین ۷۶ کیلودالتون مترشحه توسط گرانولوسیت‌ها اثر گذاشته و آن را فعال می‌کند.

فنول‌اکسیداز به فرم غیرفعال (یعنی پروفنول‌اکسیداز) در هموسیت‌ها قرار دارد و آنزیم نهایی ناشی از فعال‌شدن سیستم پروفنول‌اکسیداز است. سیستم فعال‌کننده‌ی پروفنول‌اکسیداز در اکثر بی‌مهرگان، یک سازوکار عمدهٔ دفاعی مایعی است. به دنبال آلودگی میکروبی، اجزای سیستم پروفنول‌اکسیداز شامل پروتئازها، مهارکننده‌های پروتئیناز، مولکول‌های شناسایی و پروتئین‌های اتصال دهندهٔ سلول از گرانول‌های هموسیت‌ها به داخل همولنف رها و از نظر بیولوژیکی فعال می‌شوند و با همکاری هموسیت‌ها به مقابله با عامل بیگانه می‌پردازند (Soderhall and Soderhall 2002, 439).

۲-٤- پروبیوتیک‌ها و انواع آن

۲-٤-۱ میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش

میکروارگانیسم‌ها، مجموعه‌ای از باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند که در دستگاه گوارش آبزیان ساکن بوده و به دو دسته کاملاً متمایز تفکیک می‌گردند:

یک دسته از آن‌ها باکتری‌های مفید و غیر بیماری‌زا هستند که عمدتاً شامل لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشند.
دسته دیگر باکتری های بیماری‌زا که شامل کلی‌فرم‌ها مانند *اشریشیا کلی*[1] می‌باشند.

رشد بهینه هر دو گروه تابعی از pH محیط زندگی آن‌هاست. محیط با pH خنثی برای هر دو گروه قابل تحمل است، ولی pH ٦ برای رشد لاکتوباسیلوس‌ها و pH ۸ تا ۹ برای اشریشیاکلی بسیار مناسب می‌باشند. یک میکرو فلور متعادل و معمولی در روده می‌تواند جاندار را در برابر هجوم میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به خوبی حفاظت نماید. هدف از به کارگیری محصولات زنده میکروبی، تأثیر آن بر روی فعالیت میکروب‌های دستگاه گوارش از طریق تثبیت میکروب‌های مطلوب و جلوگیری از تجمع باکتری‌های مضر و به دنبال آن کمک به حفظ سلامت جان‌دار می‌باشد (کریم‌زاده و دیگران ۱۳۸۸، ۹).

۲-٤-۲ تعریف و تاریخچه‌ی پروبیوتیک‌ها

امروزه از افزودنی‌های متنوعی در جیره غذایی موجودات پرورشی از جمله اسیدهای آمینه آزاد، ویتامین، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده، داروهای پیشگیری کننده، هورمون و محرک‌های رشد استفاده می‌شود.
محرک‌های رشد به دو دسته محرک‌های رشد طبیعی یا محرک‌های رشد غیریوتیکی[2] و محرک‌های رشد آنتی بیوتیکی[3] تقسیم می‌شوند. یکی از مهم‌ترین انواع محرک‌های رشد طبیعی، پروبیوتیک‌ها هستند.
پروبیوتیک از کلمه یونانی پروبیوس[4] گرفته شده و در لغت به معنی حمایت از حیات[5] می‌باشد. معنی و مفهوم این کلمه در طول زمان در حال تغییر بوده است و همین نشان دهنده تکامل علم بشری در مورد این محصول می‌باشد.
واژه پروبیوتیک در سال ۱۹۷۴ توسط Parker به کار برده شد. او پروبیوتیک‌ها را به عنوان ارگانیسم‌ها و موادی تعریف کرد که به برقراری توازن میکروبی دستگاه گوارش یاری می‌رسانند که تعریف گسترده‌ای

[1] *E. coli*
[2] Natural growth prometrs
[3] Antibiotic Growth Promoters, AGPs
[4] Probios
[5] For life

است و شامل آنتی‌بیوتیک‌ها هم می‌شود. اگرچه به کارگیری واژه پروبیوتیک مرتبط با مکمل‌های غذایی فقط از سال ۱۹۷۴ به بعد بوده است، ولی تاریخچه حقیقی به کارگیری مکمل‌های غذایی میکروبی به هزاران سال قبل بر می‌گردد. برای واژه پروبیوتیک تعاریف دیگری هم هست. مثلاً Fuller (۱۹۸۹) پروبیوتیک‌ها را این گونه تعریف می‌کند، پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده، تأثیرات سودمندی بر میزبان دارند که این تعریف بر ماهیت زنده بودن پروبیوتیک‌ها تاکید دارد.
در سال ۲۰۰۱ سازمان کشاورزی و غذایی[1] ایالات متحده و سازمان سلامت جهانی[2] این تعریف را تصحیح کردند و بیان نمودند که پروبیوتیک‌ها موجودات زنده‌ای هستند که در زمان استفاده و در مقدار مناسب، فواید سلامتی را به میزبان اعطا می‌کند. هنوز تغییرات جدید و اصلاح شده‌ای برای درک بهتر ما از واژه پروبیوتیک پیشنهاد می‌گردد که جنبه‌های مختلف و اعمال پروبیوتیک‌ها را شامل می‌شود و هم‌چنان نیز ادامه دارد. پروبیوتیک‌ها برای استفاده دام و انسان مقبولیت وسیعی دارند. استفاده از پروبیوتیک در آبزی‌پروری جدید است و آغازی نامشخص دارد، اما چیزی که واضح و مبرهن است این‌که پروبیوتیک می‌تواند به طور وسیعی برای ماهیان و بی‌مهرگان به‌ویژه در آمریکای جنوبی و آسیا (خصوصاً چین و هند) مورد استفاده قرار گیرد. مفهوم پروبیوتیک برای استفاده در آبزی‌پروری بسیار وسیع و گسترده است و شامل محدوده‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌ها که البته تنها شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و محصولات آن‌ها نمی‌شود و عمل‌کرد آن فقط از طریق غذا و تغذیه نمی‌باشد، بلکه ممکن است که از طریق آب نیز منتقل گردد. این میکروارگانیسم‌ها برای موجودات آبزی در صورت استفاده آن‌ها در موارد زیر مفید می‌باشند:

- بهبود اشتها و رشد
- کاهش بیماری‌های اختصاصی و غیراختصاصی که منجر به ایمن شدن جمعیت مورد نظر می‌گردد
- کاهش نیاز به درمان‌های شیمیایی پرهزینه

اگرچه پروبیوتیک‌ها نبایستی برای میزبان ضرر داشته باشند، اما همیشه تمام داده‌های آن‌ها منتشر نشده است. احتمال بیماری‌زا بودن در مورد بعضی از میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه گرم منفی‌ها به دلیل کسب ژن‌های بیماری‌زایی با حدت بالا به‌وسیله انتقال افقی ژن، زمانی که وارد محیط آبی می‌گردند، وجود دارد.

[1] Food and Agriculture Organization (FAO)
[2] World Health Organization (WHO)

۲-٤-۳ معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها

پروبیوتیک‌ها عموماً از منابع انسانی بوده و به‌عنوان باکتری‌های غیر بیماری‌زا محسوب می‌شوند. انتخاب گونه‌های پروبیوتیک عمدتاً بر پایه سابقه تاریخی استفاده از آن‌ها برای مدت‌های طولانی بدون داشتن عوارض جانبی مضر، صورت می‌گیرد. سایر معیارهای مطرح برای استفاده از گونه‌های باکتریایی مناسب عبارتند از:

۱- مقاومت و زنده ماندن در فرآیند ساخت
۲- زنده و فعال ماندن در دستگاه گوارش که به معنی مقاومت در برابر اسید معده و اسیدهای صفراوی است
۳ - توانایی اتصال به سلول‌های اپی تلیال روده
۴- توانایی آنتاگونیزه کردن پاتوژن‌ها از طریق تعادل pH ترکیبات ضد باکتری، حذف رقابتی آن‌ها یا کاهش جمعیت آن‌ها داخل کولون
۵- توانایی تثبیت فلور باکتریای روده

۲-٤-٤ مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها

افزایش توانایی استقرار[1] و اثرات مهاری بر ضد عوامل بیماری‌زا فاکتورهای مهمی هستند که پروبیوتیک‌ها میزان بروز و دوره‌ی بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. سویه‌های پروبیوتیکی با مکانیسم‌های متعددی قادرند در شرایط invitro و invivo باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند. به طور خلاصه این مکانیسم‌های مهاری در زیر توضیح داده می‌شوند:

۲-٤-٤-۱ رقابت اختصاصی

تضاد باکتریایی یک پدیده‌ی عادی در طبیعت محسوب می‌شود، بنابراین تداخلات میکروبی نقش مهمی در حفظ تعادل بین رقابت مفید و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایفا می‌کند. با این وصف، ترکیب روابط میکروبی می‌تواند به واسطه اقدامات بهداشتی و شرایط محیطی تغییر یابد. به خوبی مشخص شده‌است که فلور میکروبی مجرای گوارشی حیوانات آبزی می‌تواند تغییر یابد، برای مثال با بلعیدن میکروارگانیسم‌های دیگر، بنابراین دست‌کاری میکروبی ابزار زنده‌ای را فراهم می‌کند تا بروز اجرام بیماری‌زای فرصت‌طلب را کاهش داده یا حذف کند (Balcazar et al 2006, 96).

[1] Colonization

۲-٤-٤-۲ کمک به هضم مواد غذایی

برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که میکروارگانیسم‌ها اثر مفیدی روی مراحل هضم در حیوانات آبزی دارند. گزارش شده است که باکتریوئیدس[1] و گونه‌های کلستریدیوم در تغذیه ماهی‌ها با تولید اسیدهای چرب و ویتامین‌ها نقش مهمی دارند. علاوه براین، بعضی از باکتری‌ها ممکن است در مراحل هضم دوکفه‌ای‌ها با تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئازها، لیپازها و تولید فاکتورهای ضروری رشد شرکت نمایند. مشاهدات مشابهی برای فلور میکروبی میگوی چینی گزارش شده است که آنزیم‌های کاملی برای هضم و سنتز ترکیبات تولید می‌کنند (Balcazar et al 2006, 114).

۲-٤-٤-۳ تأثیر بر کیفیت آب

در سال‌های اخیر بهبود کیفیت آب به خصوص با استفاده از گونه‌های باسیلوس بررسی شده است. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی تبدیل‌کننده‌های خوب مواد آلی به Co_2 محسوب می‌شوند. در طی روند تولید، مقادیر بالای باکتری‌های گرم مثبت می‌تواند تشکیل کربن آلی محلول و ذره‌ای را به حداقل برسانند. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از گونه‌های باسیلوس کیفیت آب را بهبود بخشیده است (Balcazar et al 2006, 114).

۲-٤-٤-٤ تقویت پاسخ‌های ایمنی

سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌تواند تحت تأثیر باکتری‌های پروبیوتیک تحریک شود. مشخص شده است که تجویز خواکی *کلستریدیوم بوتیریکوم*[2] به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقاومت آن را نسبت به بیماری ویبریوز با افزایش فعالیت فاگسیتوز افزایش می‌دهد (Balcazar et al 2006, 114).

[1] Bacterioides
[2] *Clostridium butyricum*

۲-٤-٤-۵ اثرات ضد ویروسی

برخی از سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک دارای اثرات ضد ویروس هستند. اگرچه مکانیسم ضد ویروس پروبیوتیک‌ها هنوز مشخص نیست، اما تست‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند غیر فعال شدن ویروس‌ها می‌تواند تحت تأثیر مواد شیمیایی یا بیولوژیکی خارج سلولی این باکتری‌ها باشد. برای مثال، سویه‌های جدا شده سودموناس، ویبریو و آئروموناس از کارگاه‌های تکثیر ماهی قزل‌آلا فعالیت ضد ویروسی علیه عفونت حاصل از ویروس نکروز دهنده بافت‌های خون‌ساز[1] دارند (Balcazar et al 2006, 114).

۲-۵ محرک‌های سیستم ایمنی

محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و یا مواد سنتزی می‌باشند که با افزایش عمل‌کرد سلول‌های فاگوسیتوزکننده، فعالیت گلبول‌های سفید و تولید آنتی‌بادی موجب تحریک سیستم ایمنی و افزایش پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی میزبان می‌شوند. چنین موادی علاوه بر افزایش مقاومت موجود، خطر شیوع بیماری را نیز کاهش می‌دهند (Ringo and Gatesoupe 1998, 160).

در عمل محرک‌های ایمنی، مکمل‌های تغذیه‌ای هستند که به طور بالقوه جهت کنترل بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، با تنظیم مکانیسم‌های دفاعی میزبان بر ضد میکروارگانیسم بیماری‌زای فرصت طلب در محیط به کار می‌روند (Galindo-Villagas and Hosokawa 2004, 291).

محرک‌های ایمنی بر اساس عمل‌کرد و منبع به چند گروه تقسیم می‌شوند: مواد شیمیایی، مواد مشتق از باکتری‌ها و جلبک‌ها، پلی‌ساکاریدها و عصاره‌های گیاهی و حیوانی، فاکتورهای تغذیه‌ایی (ویتامین‌ها و اسیدهای چرب) هورمون‌ها و سیتوکین‌ها.

محرک‌های بسیاری در آبزیان مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. از جمله بتاگلوکان، پپتیدوگلیکان، لیپوپلی‌ساکارید، مورامیل دی پپتید، کیتین، لوامیزول، ترکیبات چهارتایی آمنیوم (دی کلرو بیس‌سولفات، دی متیلN-کربوداکسی‌متیل،-N- اتیلن آمونیوم) لاکتوفرین و هورمون رشد. به تازگی محققین از میدان‌های الکترومغناطیسی نیز جهت تحریک سیستم ایمنی استفاده کرده‌اند که نتایج حاصل از مطالعات این افراد رضایت بخش بوده ولی هنوز نیاز به بررسی های بیش‌تر در زمینه فرکانس، زمان تأثیر و مکانیسم عمل این میدان‌ها وجود دارد.

۲-۵-۱ خطرات استفاده از محرک‌های ایمنی در پرورش آبزیان

در پرورش آبزیان محرک‌های ایمنی با موفقیت جهت بهبود سلامت جسمانی و تولید به کار رفته‌اند، اما به طور طبیعی خطری که در استفاده از محرک‌های ایمنی وجود دارد، امکان ایجاد مشکلات غیر قابل پیش‌بینی

[1] Infectious Hematopoietic necrosis virus (IHNV)

است. یکی از مهم‌ترین عوارض ناشی از مصرف آن‌ها، ایجاد تحمل ایمنی در آبزیان می‌باشد، برای مثال نمونه‌ای از تحمل ایمنی در لارو ماهی آزاد اقیانوس اطلس گزارش شده است ولی هنوز مکانیسم آن مشخص نمی‌باشد. سایر مشکلات ناشی از مصرف محرک‌های ایمنی به خوبی مشخص نشده است و به نظر می‌رسد مواردی همچون مشکلات ضاعقه، مصرف بیش از حد آن‌ها توسط ماهیان دارای قلمرو نسبت به ماهیان تحت سلطه و مدت زمان تجویز محرک‌های ایمنی از جمله این مشکلات باشند. فواید مصرف محرک‌های ایمنی به لحاظ تئوری موجب افزایش مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی قبل از مواجهه شدن با عوامل بیماری‌زا می‌شود یا آن که به دنبال مواجه شدن با یک عامل بیماری‌زای خاص با مصرف آن‌ها میزان بقا افزایش پیدا می‌کند.

۲-۶- جمعیت میکروبی دستگاه گوارش آبزیان

Fuller (۱۹۸۹) یک تعریف دقیق از پروبیوتیک را ارائه داد که هنوز به طور گسترده استفاده می‌شود و آن عبارت است از فراهم کردن مکمل غذایی میکروبی زنده که با ایجاد توازن میکروبی در روده، اثرات سودمندی برای میزبان دارد. پروبیوتیک‌ها عمدتاً میکروارگانیسم‌های خاک‌زی گرم مثبت و از جنس لاکتوباسیلوس‌ها هستند. بکارگیری تعریف مفروض در آبزی‌پروری مشابه با تعریف آن برای انسان و حیوانات خاک‌زی است که نیازمند تغییرات جزئی می‌باشد. بدین صورت که میکروارگانیسم‌های روده ماهیت مستقل از موجود زنده ندارند و تأثیرات متقابل با محیط و عمل‌کردهای میزبان دارند. بسیاری از محققان واکنش‌های میکروارگانیسم‌های روده‌ای را با محیط آبزیان و خوراک‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند. تحقیقات مختلف، حضور باکتری‌ها در محیط آبزیان و اثراتش را بر ترکیب میکروفلورای روده نشان داد. به طور کلی به نظر می‌رسد گونه‌های میکروبی موجود در روده از همان گونه‌هایی باشند که در محیط و یا جیره وجود دارند که توانسته اند در روده زنده مانده و تکثیر شوند و به هر حال می‌توان ادعا کرد که تغییر شرایط محیطی بر سیستم‌های فیزیولوژیکی آبزیان نسبت به حیوانات خاک‌زی و انسان‌ها اثرات وسیع‌تر و سریع‌تری دارد.

در واقع فعل و انفعالات بین میکروارگانیسم و میزبان، هم از نظر کیفی و هم کمی برای گونه‌های آبزی و خاک‌زی متفاوت می‌باشد. در یک محیط آبزی، میزبان‌ها و میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم سهیم هستند. در بعضی موارد میکروب‌ها در یک محیط آبزی زندگی با میزبان بالقوه (روده، آبشش‌ها و پوست) را انتخاب می‌کنند. باکتری‌های محیطی توسط موجود میزبان به طور مداوم از طریق غذا خوردن و یا آشامیدن جذب می‌شوند و به طور خاص می‌توان در آبزیان، که باکتری را به میزان بالا از محیط کشت آبی جذب می‌کنند، مشاهده کرد.

۲-۶-۱ حضور باکتری اسید لاکتیک در دستگاه گوارش

تحقیقات اخیر نشان داده که گونه‌های لاکتوباسیلوس، نقش قابل توجهی در مراحل هضمی دستگاه گوارش گونه‌های مختلف حیوانات اهلی جوان بازی می‌کنند و شواهد موجود در خصوص این‌که حداقل برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند متابولیسم باکتریایی روده را تغییر دهند، بسیار قوی است.
لاکتوباسیل‌ها ارگانیسم‌های اسید دوست و تخمیری هستند که اسید لاکتیک تولید کرده تا تعادل اسید را در روده تثبیت کند. یک آبزی به طور مداوم در معرض دامنه وسیعی از حضور میکروارگانیسم‌ها در محیط می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که *Stereptococcus Leucontococcus,Lactobacillus, Canobacterium* به میکروب‌های زنده طبیعی معدی-روده ایی در ماهی سالم تعلق دارند. اگرچه جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *Stereptococcus ،Entrococcus ،Lactococcus ،Lactobacillus* در شکم، کلیه، قلب، کبد و طحال پیدا نشده‌اند. هم‌چنین گزارش شده است که بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک که از محیط معدی-روده‌ایی ماهی جدا شده‌اند، می‌توانند به عنوان پروبیوتیک عمل کنند و این‌ها قادر به احاطه روده می‌باشند (کریم‌زاده و دیگران ۱۳۸۸، ۱۳۲).

۲-٦-۲ خصوصیات لاکتوباسیلوس‌ها

لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند، گرم مثبت، میله‌ای شکل، بدون اسپور، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، معمولاً بدون حرکت و نیترات را احیاء نمی‌کنند و طول آن‌ها به ۱۰ میکرون می‌رسد. لاکتوباسیلوس‌ها با داشتن بیش از ۱۰۰ گونه بزرگ‌ترین جنس باکتری‌های لاکتیک اسید به شمار می‌روند، گونه‌های این جنس با داشتن خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی متنوع، بسیار ناهمگون می‌باشند. اعضاء این جنس در طبیعت در زیستگاه‌های مختلف غنی از کربوهیدرات یا پروتئین نظیر گیاهان و غذاهای فاسد یافت می‌شوند و بهترین pH برای رشد لاکتوباسیلوس ۵ تا ٦/۵ است. هم‌چنین تراکم ۵ درصد دی‌اکسیدکربن تأثیر به سزایی بر رشد آن‌ها دارد. علاوه بر این، تعدادی زیادی از آن‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش و مجرای تناسلی انسان و دام‌ها هستند. به دلیل قدمت زیاد استفاده از آن‌ها در تخمیر مواد غذایی و صنعت مواد غذایی و همچنین فقدان بیماری‌زایی آن‌ها عموماً به‌عنوان ارگانیسم‌های ایمن شناخته می‌شوند (Ringo and Gatesoupe 1998, 160; Avall-Jaaskelainen and Palva 2005, 29).
محققان توانستند برخی از گونه‌های لاکتوباسیلوس را از روده اکثر ماهیان استخوانی در تمام مراحل زندگی شامل لاروی، انگشت قد و بالغ جدا سازند. کشت لاکتوباسیلوس در نوترینت آگار، ضعیف است، اما اگر به محیط گلوکز و عصاره مخمر یا خون اضافه شود رشد آن‌ها بهتر صورت می‌گیرد. اپتیمم دمایی آن‌ها ۳۰ تا

۴۰ درجه سانتی‌گراد است و نوع ترموفیل آن‌ها از دمای ۵۲ درجه به بالا رشد دارند. در حال حاضر جهت جداسازی و تشخیص اعضای این جنس از بافت‌های مختلف آبزیان، معیارهای زیر مدنظر است:

- حضور مزو ـ دی آمینوپیمیلیک اسید[1] در دیواره سلولی باکتری
- ایزومرهای اسید لاکتیک حاصل از مصرف کربوهیدرات‌ها
- تولید سیترولین از آرژینین
- رشد روی محیط استات آگار با pH = ۵/٤
- محیط انتخابی MRS[2]
- وجود اسیدهای چرب ۱۸ کربنه با یک پیوند دوگانه در دیواره سلولی
- استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[3]

۲-۷ عمل‌کرد دستگاه گوارش

فرآیند هضم در آبزیان به خوبی شناخته شده است. هضم مواد مغذی در دستگاه معدی-روده‌ای انجام شده و توسط آنزیم‌های معده، پانکراس و روده و یا هپاتوپانکراس صورت می‌گیرد، اما فرآیند جذب و انتقال مواد مغذی توسط سلول‌های روده انجام می‌شود. معده، ترشحات پانکراس و روده در ماهی و هپاتوپانکراس در میگو، آنزیم‌های گوناگونی را تولید می‌کنند. فعالیت پروتئازهای اسیدی اغلب در معده وجود دارد، این فعالیت به علت فعال‌سازی پپسینوژن در پپسین است. غدد مترشحه پانکراس پس از ساخته شدن آنزیم‌ها که تعداد زیادی هستند مانند گلوکوسیداز، لیپاز و پروتئازها به داخل حفره روده ترشح می‌شوند، این پروتئازها که در محیط قلیایی فعالیت می‌کنند توسط تریپسین فعال می‌شوند که خود توسط انتروکیناز فعالیت خود را شروع می‌کند که آنزیم مترشحه از سلول‌های روده است.

بیش‌ترین هضم آنزیمی مواد غذایی در روده اتفاق می‌افتد. این آنزیم‌ها ممکن است توسط غده پانکراس یا هپاتوپانکراس و سلول‌های ترشحی دیواره روده ترشح شوند (Jobling 1995, 175). آنزیم‌های پانکراسی با شروع تغذیه فعال ترشح می‌شوند (Cara et al 2003, 63) و میزان ترشح آن‌ها با بالا رفتن سن، افزایش می‌یابد (Cahu and Zambonino Infante 2001, 200).

اپیتلیوم روده‌ای بخشی از سیستم گوارشی است که هضم نهایی ترکیبات پپتیدی را بر عهده دارد. پپتیدازهای روده‌ای در دو ناحیه سلول‌های رویی در روده شامل ناحیه سیتوزولی[4] و لبه‌های نوار مسواکی[5] (براش بوردر،

[1] Meso-diaminopimelic acid
[2] De Man, Rogosa and Sharpe
[3] Polymerase Chain Reaction
[4] Cytosol
[5] Brush Border Membrane

BBM) سلول‌های روده‌ای[1] دیده می‌شوند. آنزیم‌های سیتوزولیک عمدتاً شامل دی و تری پپتیدازها هستند که در سیتوزول سلول‌های روده‌ای قرار داشته و هیدرولیز پروتئین‌ها را با شکستن پپتیدها و تبدیل آن‌ها را به اسیدآمینه انجام می‌دهند. با بلوغ سلول‌های روده‌ای، هم‌زمان با کاهش ترشح فعالیت آنزیم‌های سیتوزولیک، ترشح آمینوپپتیدازN و آلکالین فسفاتاز (آنزیم‌های BBM) افزایش می‌یابد و این امر سبب بهبود بقا می‌شود (Mahious et al 2005, 14). این آنزیم‌ها نقش مهمی در تجزیه مواد غذایی و تبدیل آن به مواد قابل جذب توسط سلول دارند.

۲-۷-۱ فرآیند هضم توسط آنزیم‌های گوارشی

هضم پروتئین یک فرآیند پیچیده است که از معده شروع می‌شود و به کمک آنزیم‌های زوائد پیلوریک و روده ادامه می‌یابد. از این روی، پروتئازهای اسیدی مانند پپسین و پپتیداز از عوامل مهم هضم پروتئین در سیستم گوارش هستند. پروتئازهای اسیدی در معده بیش‌تر از روده و زوائد پیلوریک قرار دارند. پروتئازها نقش کلیدی در عملیات هضم را ایفا می‌کنند. این آنزیم‌ها فقط به وسیله پانکراس تولید نمی‌شوند، بلکه به وسیله‌ی میکروفلورهای داخلی و نیز آنزیم‌های وارد شده توسط طعمه وارد می‌شوند که همه‌ی این آنزیم‌ها در درون روده نقش خود را ایفا می‌کنند. هم‌چنین انتروسیت‌های روده نیز آنزیم‌های خود را وارد حفره روده می‌کنند (Kuz’mina et al 2010, 37).

بررسی آنزیم‌های گوارشی در ماهی و میگو از جنبه فیزیولوژی تغذیه‌ای حائز اهمیت می‌باشد و می‌تواند به حل برخی مشکلات تغذیه‌ای کمک نماید (Hidalgo et al 1999, 170). مطالعه آنزیم‌های گوارشی یک گام ضروری به سوی پی بردن به مکانیسم گوارش میگو می‌باشد و نقش مهمی در هضم مواد غذایی برعهده داشته و آگاهی از سطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی میگوها موثر باشد. از طرف دیگر بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های پرورشی می‌تواند در انتخاب ترکیبات غذایی مناسب، سودمند باشد (Kuzmina and Skvortsova 2001, 4).

[1] Enterocyte

۲-۸- آنزیم‌ها

۲-۸-۱ نقش و اهمیت آنزیم‌ها

آنزیم‌ها پروتئین‌هایی هستند که توسط سلول‌های موجود زنده ساخته شده، به انجام واکنش‌های شیمیایی کمک کرده و سرعت آن‌ها را افزایش می‌دهند (کاتالیزور)[1] و پس از پایان واکنش بدون تغییر به شکل اصلی خود باز می‌گردند. بعضی از آنزیم‌ها علاوه بر ساختار پروتئینی خود، دارای یک ساختار غیر پروتئینی نیز هستند که کوفاکتور[2] نامیده می‌شود. کوفاکتور می‌تواند یک یون فلزی و یا ترکیبی از مولکول‌های آلی باشد که در این حالت کوآنزیم[3] نامیده می‌شود. به بخش پروتئینی آنزیم آپوآنزیم[4] می‌گویند. در واکنش‌های آنزیمی ماده‌ای که تحت تأثیر آنزیم قرار می‌گیرد، سوبسترا[5] و ماده‌ای که در جریان واکنش تولید می‌شود، محصول یا فرآورده[6] نامیده می‌شود. هر واکنش آنزیمی شامل ۳ مرحله است:

۱- در این مرحله آنزیم، سوبسترا را شناسایی می‌کند و کمپلکس آنزیم- سوبسترا را تشکیل می‌دهد که با آرایش ویژه‌ای به یکدیگر می‌چسبند
۲- سوبسترا به فرآورده تبدیل شده و کمپلکس آنزیم- فرآورده تولید می‌شود
۳- فرآورده از آنزیم جدا شده و آنزیم به حالت اولیه خود باز می‌گردد

سرعت واکنش‌های آنزیمی به عواملی مانند درجه حرارت، pH، غلظت سوبسترا و غلظت آنزیم بستگی دارد. آنزیم‌ها در درجه حرارت پایین فعالیت چندانی ندارند، ولی با افزایش درجه حرارت فعال‌تر می‌شوند، تا این‌که در درجه حرارت معینی (درجه حرارت اپتیمم) حداکثر فعالیت را از خود نشان می‌دهند. در درجه حرارت‌های بالاتر از درجه حرارت اپتیمم به علت بهم ریختن ساختمان خود فعالیت خود را از دست داده و دیگر فعال نمی‌شوند. درجه‌ی حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دمای استانداردی است که برای تعیین فعالیت آنزیمی در پستانداران و بعضی ماهیان استفاده می‌شود (Hidalgo et al 1999, 170). هرگونه تغییرات pH سبب تغییر فعالیت آنزیمی می‌گردد. pH اپتیمم اغلب آنزیم‌ها در محدوده ۵ تا ۹ می‌باشد، اما آنزیم‌هایی مانند پپسین نیز وجود دارند که pH اپتیمم آن‌ها در محدوده‌های کاملاً اسیدی است (شهبازی و ملک‌نیا ۱۳۷۰، ۳۲۱).

[1] Catalyser
[2] Cofactor
[3] Coenzyme
[4] Apoenzyme
[5] Substrate
[6] Product

۲-۸-۲ آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی

۲-۸-۲-۱ آلفا-آمیلاز[1]

این آنزیم از دسته آنزیم‌های آمیلولیتیک است که بر روی کربوهیدرات‌ها اثر گذاشته و اتصالات α-1,4 را می‌شکند. یون Cl^- فعال کننده آن است. کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای مانند نشاسته توسط دسته‌ای از آنزیم‌ها تجزیه می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها آلفا-آمیلاز است. تجزیه نشاسته توسط آلفا-آمیلاز منجر به تولید مالتوز می‌شود. آلفا-آمیلاز نیز مانند تریپسین و کیموتریپسین از هپاتوپانکراس ترشح و در روده عمل می‌کند.

۲-۸-۲-۲ پروتئاز قلیایی

آنزیم اصلی قرارگرفته در این دسته یک سرین پروتئاز بوده که دارای فعالیت مشابه با تریپسین می‌باشد. دامنه فعالیت آن در محدوده pH ٦/٥ تا ۹ بوده و بازدارنده تریپسین بر روی آن اثر بازدارندگی شدید دارد. این آنزیم باندهای پپتیدی اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین را از قسمت کربن انتهایی هیدرولیز می‌نماید.

۲-۸-۲-۳ آلکالین فسفاتاز[2]

این آنزیم‌ها در هیدرولیز و سنتز استرهای اسید فسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسید فسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی تأثیر داشته و آن را تسریع می‌کند. نقش مهمی در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت حیوانات آبزی و رشد و نمو موجودات زنده بر عهده داشته و در فرآیند متابولیکی مختلف به ویژه در رشد و تشکیل استخوان نقش دارد (Senger et al 1995, 201).

۲-۸-۲-٤ لیپاز[3]

بیشترین لیپید ذخیره‌ای در گیاهان و جانوران از نوع استر است که از گلیسرول و اسیدهای چرب با زنجیره بلند تشکیل شده است. این اسیل‌گلیسرول‌ها[4] به آسانی هیدرولیز نمی‌شوند و درجه حلالیت بسیار پایینی دارند که در این میان لیپاز نقش مهمی دارد. این آنزیم عمدتاً از پانکراس (در سخت‌پوستان هپاتوپانکراس)

[1] α-Amylase
[2] Alkaline phosphatase
[3] Lipase
[4] Acylglycerol

ترشح می‌شود ولی در ترشحات معده و روده برخی گونه‌ها نیز دیده می‌شود. لیپاز عمدتاً در سطح تماس لیپید و آب که توسط امولسیفیکاسیون[1] (معلق‌سازی) لیپیدها تشکیل می‌شود، فعال است.

۲-۸-۲-۵ تریپسین[2]

این آنزیم از پروتئازهای روده‌ای بوده که وظیفه هضم پروتئین و تبدیل آن به پپتیدها را بر عهده دارد. تریپسین یک آنزیم آندوپپتیداز است، یعنی بر روی اتصالات پپتیدی موجود در داخل زنجیره پروتئینی اثر گذاشته و مولکول پروتئینی بزرگ را به پپتیدهای کوچک تبدیل می‌کند. این آنزیم اتصالات پپتیدی را از سمت گروه آمینی در جایی که اسید آمینه لیزین و آرژینین قرار دارد می‌شکند. این آنزیم ابتدا به صورت غیرفعال (تریپسینوژن) در هپاتوپانکراس تولید شده و بعد از ورود به روده توسط آنزیم انتروکیناز[3] که توسط سلول‌های جدار روده تولید می‌شود، در pH قلیایی به شکل فعال یعنی تریپسین تبدیل می‌شود.

۲-۸-۲-٦ کیموترپسین[4]

این آنزیم از دیگر آنزیم‌های پروتئولیتیک روده‌ای بوده که به شکل غیر فعال کیموتریپسینوژن در هپاتوپانکراس تولید شده و سپس در روده در pH قلیایی، با جدا شدن یک مولکول کوچک پپتید از کیموتریپسینوژن، در نتیجه فعال شدن تریپسین، فعال شده و تبدیل به کیموتریپسین می‌شود. کیموتریپسین مانند تریپسین یک آندوپپتیداز است، با این تفاوت که اتصالات پپتیدی را در جایی که اسید آمینه‌های آروماتیک (تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان) یا هیدروفوبیک (مانند متیونین، گلوتامین، آسپاراژین و لوسین) باشد را می‌شکند (Jobling 1995, 175).

[1] Emulsification
[2] Trypsin
[3] Entrokinase
[4] Chymotrypsin

۲-۹- پروبیوتیک‌های مورد بررسی

۲-۹-۱ باکتری پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی[1]

گونه‌ای از باکتری‌های کوکسی گرم مثبت است که اغلب به صورت جفت و یا تتراد وجود دارد. پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی یک باکتری تخمیری است که می‌تواند در طیف گسترده‌ای از pH، دما و فشار اسمزی رشد کند، بنابراین قادر به کلونیزه شدن در دستگاه گوارش است (Klaenhammer 1993, 12).

پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی به عنوان پروبیوتیکی مؤثر که نتایج امیدوار کننده‌ای در بررسی‌های انجام شده بر روی حیوانات و انسان داشته، مطرح است. این باکتری معمولاً در سبزیجات تخمیر شده، محصولات لبنی و گوشت یافت می‌شود (Barros et al 2001, 39). باکتری مذکور بی‌هوازی اجباری بوده که در محیط کشت MRS با یک شبانه روز انکوباسیون در دمای ۳۷ تا ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH ۶/۲ به خوبی رشد می‌کند. هر چند در دماهای بالاتر از ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز مقاوم است (Lin 2006). هم‌چنین یک باکتری اسید دوست است که در pHهای بسیار پایین زنده می‌ماند، به همین علت می‌توانند در شرایط اسیدی محیط دستگاه گوارش مقاوم باشند. پدیوکوکوس‌ها حساسیت کم‌تری به اکسیژن دارد و در برابر میکروارگانیسم‌های دیگر از جمله پاتوژن‌های روده‌ای دارای اثرات آنتاگونیستی بوده که در درجه اول از طریق تولید اسید لاکتیک، سپس با ترشح باکتریوسین‌ها با عنوان پدیوسین[2] عمل می‌کنند (Daeschel and Klaenhaemmer, 1985, 50).

برخی مطالعات مزایای بالقوه پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی را در مدولاسیون (تلفیق) جوامع باکتریایی روده و تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی نشان داده است (Ferguson et al 2010, 109). این گونه از کلونیزه شدن برخی عوامل بیماری‌زا مانند *Shigella*، *Shigella*، *Clostridium difficile* و *Escherichia coli* در روده کوچک جلوگیری می‌کند. این پروبیوتیک موادی را ترشح نموده که باکتری‌های بیماری‌زا را مهار می‌کند. هم‌چنین دارای تاثیرات مثبتی در درمان یبوست، اسهال، کاهش استرس و افزایش پاسخ‌های ایمنی، عدم تحمل لاکتوز و بیماری‌های آلرژیک می‌باشند (Retno and Siti 2012).

[1] *Pediococcus acidilactici*
[2] Pediocin

۲-۹-۲ باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس[1]

یک باکتری کروی و گرم مثبت است که به‌طور گسترده در تولید دوغ و پنیر استفاده می‌شود (Madigan and Martinko 2005). به تازگی به عنوان اولین ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی مطرح شده که به صورت زنده برای درمان برخی بیماری‌های انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Braat et al 2006, 4). سلول‌های این باکتری کوکسی بوده که به صورت جفت و یا زنجیره‌های کوتاه هستند، تخم‌مرغی شکل بوده و بسته به شرایط رشد به طول ۱/۵-۰/۵ میکرومتر به مشاهده می‌شوند. لاکتوکوکوس لاکتیس اسپور تولید نمی‌کند و متحرک نیست.

این باکتری بی‌هوازی اجباری است که با تخمیر اسید لاکتیک کربوهیدرات‌ها را به اسید لاکتیک تبدیل می‌کند. تخمیر لاکتیک اسید می‌تواند L- اسید لاکتیک و در pH پایین، D-اسیدلاکتیک تولید کند.

لاکتوکوکوس لاکتیس را می‌توان به طور طبیعی در گیاهان و در دستگاه گوارش چارپایان یافت. اعتقاد بر این است که در طبیعت، این باکتری به صورت غیرفعال در سطح گیاهان باقی مانده و زمانی که به همراه گیاه وارد دستگاه گوارش حیوانات گردید، فعال شده و به سرعت تکثیر می‌یابد (Bolotin et al 2001, 11). توانایی تولید اسیدلاکتیک یکی از دلایلی است که این باکتری از مهم‌ترین ارگانیسم‌ها در صنعت لبنیات است. زمانی که لاکتوکوکوس لاکتیس به شیر اضافه می‌شود، این باکتری با استفاده از آنزیم‌ها مولکول‌های انرژی (ATP) را از لاکتوز تولید می‌کند. محصول فرعی تولید انرژی ATP، اسید لاکتیک است. از دیگر موارد کاربردی که برای این باکتری گزارش شده تولید ترشی سبزیجات، آب‌جو و شراب، برخی نان‌ها و دیگر مواد غذایی تخمیر شده مانند ماست، شیر سویا، کفیر و غیره است.

۲-۱۰- ویتامین C

ویتامین C یا L-اسید اسکوربیک، یک ماده مغذی ضروری برای انسان و برخی از گونه‌های جانوری دیگر است. ویتامین C به عنوان یک کوفاکتور در حداقل هشت واکنش آنزیمی، از جمله چند واکنش سنتز کلاژن بوده که زمانی که در این عمل اختلال ایجاد شود، باعث ایجاد شدیدترین علائم اسکوری می‌گردد. این واکنش‌ها به‌ویژه در بهبود زخم و در جلوگیری از خونریزی مویرگ‌های خونی مهم است. هم‌چنین آسکوربات ممکن است به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در برابر استرس‌های اکسیداتیو عمل کند (Padayatty et al 2003, 22). آسکوربات (آنیون اسید اسکوربیک) برای طیف وسیعی از واکنش‌های متابولیکی جانوران و

[1] *Lactococcus lactis*

گیاهان ضروری است. این ماده تقریباً توسط همه موجودات زنده ساخته می‌شود، البته برخی از گونه‌های پرندگان و ماهی توانایی سنتز آن را نداشته و آسکوربات مورد نیاز باید از طریق رژیم غذایی تأمین شود.

اگر چه بسیاری از حیوانات خشکی‌زی توانایی سنتز آسکوربیک اسید را از گلوکورونیک اسید دارند، ماهیان و سخت‌پوستان به دلیل نداشتن آنزیم گلوکونولاکتون اکسیداز، که مرحله نهایی این فرآیند بیوسنتر است، امکان تولید ویتامین C را ندارند (Dabrowski 1990, 84)، لذا به کمبود این ویتامین حساس می‌باشند. ویتامین C برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری در جانوران خشک‌زی و آبزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در سخت‌پوستان این سری مطالعات بسیار محدود است. به صورت سنتی، L–اسید اسکوربیک تنها منبع ویتامین C در غذای پرورش میگوها می‌باشد. اگرچه L–اسید اسکوربیک پایدار نبوده و نشان داده شده که در طی فرآوری و انبار تحت تأثیر فشار، دمای بالا، اکسیژن و نور میزان آن در غذا به شدت کاهش می‌یابد (Soliman et al 1987, 60). Shiau و Hsu (۱۹۹٤) نشان دادند که حدود ۷۵ درصد از میزان اولیه مکمل‌های L–اسید اسکوربیک در غذای میگو طی فرآوری در دمای محیط از بین می‌رود. ماهیت ناپایدار L–اسید اسکوربیک نیاز به استفاده از مشتقات آن در خوراک میگو دارد. برای جبران این کمبود، فرم‌های با ثبات‌تر از اسید اسکوربیک از جمله L–آسکوربیل ۲–سولفات، L–آسکوربیل ۲–پلی فسفات، L–آسکوربیل ۲–منو فسفات سدیم و L–آسکوربیل ۲–منو فسفات منیزیم استفاده شده که میزان نیاز ویتامین C برای میگوهای پنائیده تأمین شود (Hsu and Shiau 1998, 163).

ویتامین C نقش بسیار مهمی را در سلامتی موجود به عنوان آنتی‌اکسیدان، غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد تولید شده به وسیله فعالیت طبیعی سلول‌ها و استرس‌های مختلف دارد (Halver 1995, 11). اسید اسکوربیک یک ماده ضرروی برای میگوهای پنائیده محسوب می‌شود، زیرا به نگهداری و رشد میگو کمک کرده و به عنوان کوفاکتور در بسیاری از واکنش‌های شیمیایی در بدن موجودات شرکت می‌کند (Niu et al 2009, 2; Wang et al 2006, 12). علاوه بر این، نقش آن به عنوان آنتی‌اکسیدان، زدودن سموم ناشی تولید پروکسید در اثر متابولیسم بدن (Darias et al 2011, 315) و به عنوان عامل ضد استرس و محرک سیستم ایمنی نیز اهمیت دارد (Lee and Shiau 2002, 12). در برخی تحقیقات اشاره شده است که استفاده از ویتامین C در جیره غذایی باعث افزایش نرخ بازماندگی، پارامترهای رشد، هماوری و کیفیت بالای گوشت میگو می‌گردد (Racotta et al 2004, 233). به طوری که Moe و دیگران (۲۰۰۵) گزارش کردند که استفاده از سطوح ناکافی ویتامین C در جیره غذایی جونایل‌های میگو باعث کاهش نرخ رشد، اشتها، توانایی ترمیم بافت‌های آسیب دیده، مقاومت در برابر استرس، افزایش تناوب پوست‌اندازی و هم‌چنین پوست‌اندازی ناقص می‌شود.

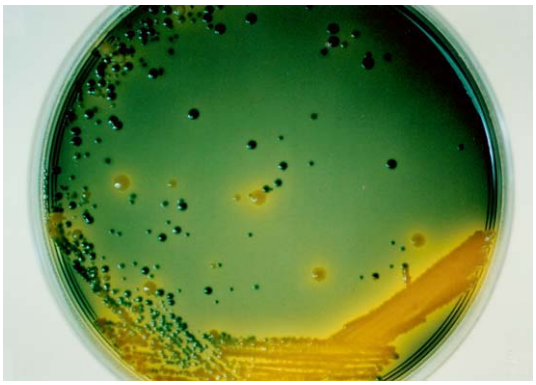
۲-۱۱- خصوصیات کلی خانواده ویبریوناسه

باکتری‌های این خانواده گرم‌منفی، میله‌ای شکل، خمیده، متحرک و دارای تار لرزان قطبی بوده و در بعضی شرایط خاص محیط کشت، داری چندین تار لرزان طرفی می‌باشند. همه‌ی ویبریوها، بدون کپسول و بدون اسپور هستند و اکسیداز و کاتالاز مثبت دارند، کموارگانوتروف و بی‌هوازی اختیاری هستند، متابولیسم آن‌ها تنفسی و تخمیری است. گلوکز را به عنوان منبع کربن و تولید انرژی مورد مصرف قرار می‌دهند. اکثر آن‌ها برای رشد نیاز به ۲ تا ۳ درصد کلریدسدیم دارند و بسته به گونه در آب‌های شور و شیرین و هم‌چنین جانوران آبزی یافت می‌شوند (Austin and Austin 1999, 121). مهم‌ترین جنس‌های این خانواده شامل ویبریوها[1]، آئروموناس‌ها[2] و پلیسیموناس[3] ها می‌باشند.

۲-۱۱-۱ خصوصیات کلی باکتری ویبریو

ویبریوها باکتری‌هایی میله‌ای شکل، مستقیم یا خمیده هستند که با تاژک تک‌قطبی خود به‌خوبی متحرکند. بدون کپسول و بدون اسپور هستند و اکسیداز و کاتالاز مثبت دارند. در محیط‌های مختلف یافت می‌شوند، به ویژه در جاهایی که میزان مواد آلی بالا باشد. در این جنس متجاوز از ۲۰ گونه وجود دارد.

میکروارگانیسم‌های این گروه قادر به رشد در محیط‌های دارای غلظت فراوان نمک هستند. یازده گونه از ویبریوها برای انسان از نظر کلینیکی حائز اهمیت می‌باشند (Austin 2010, 140). ویبریو پاراهمولیتیکوس یک میکروارگانیسم نمک‌دوست دریایی است (Alam et al 2002, 2007; Nishibuchi and Kaper 1995, 63) که دارای اهمیت در علم پزشکی انسانی است.



شکل ۲-۱: کلونی‌های جنس ویبریو بر روی محیط TCBS

[1] *Vibrio*
[2] *Aeromous*
[3] *Plesiomonas*

۲-۱۱-۲ گونه‌های مهم خانواده ویبریوناسه

۱- ویبریو کلرا
۲- ویبریو پاراهمولیتیکوس
۳- ویبریو ولنیفیکوس[۱]
٤- ویبریو فیشری[۲]
۵- ویبریو باکتریا[۳]
٦- ویبریو هاروی[٤]
۷- ویبریو آلژینولیتیکوس[۵]

۲-۱۱-۳ خصوصیات باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

ویبریو پاراهمولیتیکوس یک باسیل نمک‌دوست و گرم منفی، خمیده، متحرک و هوازی است که بیش‌تر در محیط‌های دریایی و آب‌های شور یافت می‌شود (Rahimi et al 2010, 7).

این باکتری یکی از عوامل عفونی غذایی به ویژه آسیای جنوب شرقی به خصوص در ژاپن می‌باشد، به طوری که بیماری اولین بار در ۱۹۵۷ در این کشور گزارش شد (Bej et al 1999, 36). باکتری مذکور دارای سر و تیپ‌های مختلف می‌باشد که همگی بیماری‌زا نیستند و چنین به نظر می‌رسد که مکانیسم بیماری‌زایی این ارگانیسم بیش‌تر در ارتباط با تهاجم آن است تا تولید آنتروتوکسین. انتقال بیماری ناشی از این باکتری به انسان به دنبال مصرف فرآورده‌های دریایی آلوده مانند صدف و یا گوشت خام یا نیم‌پز ماهی و میگو صورت می‌گیرد.

انواع ویبریوها مانند بسیاری از باکتری‌های گرم‌منفی در محیط‌های حاوی نمک‌های صفراوی و محیط‌های قلیایی رشد کرده و هوازی اختیاری هستند. محیط کشت TCBS بهترین محیط کشت جهت جدا کردن ویبریو شناخته شده است (Austin and Austin 1999, 121).

[1] *V. vulnificus*
[2] *V. fischeri*
[3] *V. bacteria*
[4] *V. harveyi*
[5] *V. alginolyticus*

فصل سوم

روش اجرای تحقیق

۳-۱- طراحی آزمایش

۳-۱-۱ مکان و زمان تحقیق

این تحقیق در مرکز توسعه آبزیان دریایی شهید کیانی در چعبده آبادان از پایان جیره کور تا انتهای دوره پرورش در تابستان ۱۳۹۲ انجام شد. بدین منظور از ۴ استخر ۰/۵ هکتاری با تراکم و شرایط نگهداری تقریباً یکسان استفاده گردید. پست‌لاروها از مرکز تکثیر میگوی چوئیبده آبادان فراهم شدند. پست‌لارو ۲۰ روزه (PL20) با تراکم ۳۰۰ پست لارو در متر مربع به استخرها معرفی شدند. کل دوره در حدود ۱۰۰ روز از انتهای جیره کور تا زمان صید بود. رودخانه بهمن‌شیر محل تامین آب مزرعه بود.

پارامترهای کیفی آب شامل اکسیژن محلول، دما و pH (با استفاده از دستگاه قابل حمل WTW ساخت کشور آلمان) به صورت روزانه و آمونیاک کل (با کیت سنجش آمونیاک مارک کاریزاب ساخت ایران) هفتگی اندازه‌گیری شد. در ابتدای دوره‌ی پرورش وزن کل میگوها با ترازوی دیجیتالی با دقت یک‌صدم گرم و طول کل و طول کاراپاس با استفاده از کولیس ثبت گردید.

۳-۱-۲ تیمار بندی

در این آزمایش ۴ تیمار 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 Blagnac Cedex France تهیه شد. میزان غلظت اولیه ۱×۱۰^{۹} واحد تشکیل کلونی در گرم ($cfu\ g^{-1}$) بود.

تیمار ۳ (T.3): پروبیوتیک *Lactococcus lactis* بومی ایران بود که دارای غلظت اولیه ۱×۱۰^{۹} واحد تشکیل کلونی در گرم ($cfu\ g^{-1}$) بود.

تیمار (T.4): ویتامین C

۳-۱-۳ غذادهی

غذای استفاده شده در کل دوره از شرکت هوروراش بوشهر (تولید کننده غذای ماهی و میگو) تأمین شد. اجزای غذایی شامل پودر سویا، پودر ماهی، پودر اسکوئید، پودر سر میگو، آرد گندم، سبوس گندم، لسیتین، کلسترول، نشاسته، کلسترول، نشاسته، دی کلسیم فسفات، مخلوط ویتامین، مواد معدنی و همبند بود.

جدول ۳-۱: ترکیب غذایی غذای مورد استفاده در طول دوره پرورش

نام تجاری	پروتئین خام	چربی خام	فیبر	خاکستر	رطوبت
۴۰۰۳	۳۸	۹	۳	۱۴	۱۰
۴۰۰۴	۳۶	۸	۳	۱۴	۱۰
۴۰۰۵	۳۴	۸	۴	۱۴	۱۰

با توجه به این که در سنین پایین‌تر، میزان پروتئین مورد نیاز بدن بیش‌تر است، از غذای ٤٠٠٣ از زمان معرفی پست لارو به استخر تا وزن ٦-٥ گرمی میگو استفاده شد. از وزن ٦ تا ١٤ گرم از غذای ٤٠٠٤ و از آن به بعد تا زمان صید از غذای ٤٠٠٥ استفاده شد.

۳-۱-۴ نحوه غذادهی

پروبیوتیک‌ها و ویتامین C به میزان ۲ گرم در کیلوگرم غذا در آب حل شده و در هر وعده غذادهی بر روی غذا اسپری شد. جهت جلوگیری از حل شدن سریع مواد نام برده در آب، یک لایه پوششی توسط اسپری کردن روغن سویا بر روی غذا ایجاد گردید. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام شد.

۳-۱-۵ دفعات و میزان غذادهی

روزانه ۴ بار (۷ صبح، ۱۲ ظهر، ۴ عصر و ۸ شب) غذادهی به میگوها انجام شد. میزان غذا بر اساس بیوماس (معمولاً ۵ درصد)، درجه حرارت آب و روش چک سینی بود. به این صورت که ۲ ساعت پس از غذادهی، سینی‌های موجود در کف استخر کنترل شده، در صورتی که غذا در سینی‌ها مانده بود، در وعده بعد مقدار غذا را کاهش داده و اگر غذایی باقی نمانده و یا ناچیز بود، در وعده بعد، مقدار غذا افزایش داده می‌شد.

۳-۱-۶ زیست‌سنجی[1]

نمونه‌برداری به صورت هفتگی و کاملاً تصادفی با پرتاب تور ماشک (سالیک) انجام شده و زیست‌سنجی شامل وزن کل[2] با ترازوی دیجیتالی با دقت یک‌صدم گرم، طول کل[3] و طول کاراپاس[4] با استفاده از کولیس از حدود ۱۵۰-۱۰۰ نمونه از هر تیمار انجام شد. این عمل در طول دوره‌ی پرورش انجام گردید. پس از حدود ۳ ماه و رسیدن وزن میگوها به اندازه بازاری عملیات صید انجام شد.



(ب) (الف)

شکل ۳-۱: الف- میگوی وانامی ب- زیست‌سنجی میگوی وانامی

۳-۱-۷ انتقال نمونه‌ها به صورت زنده

میگوها در بشکه‌های بزرگ و با تراکم مناسب از مرکز توسعه‌ی آبزیان دریایی شهید کیانی واقع در چعبده آبادان به مرکز جهاد دانشگاهی کشاورزی و منابع طبیعی اهواز منتقل و در اکواریوم‌ها با تراکم مناسب نگه‌داری شدند. انتقال در شب انجام شد و در حین انتقال از هواده و ویتامین C جهت کاهش استرس استفاده گردید. زمان نگه‌داری میگوها در آکواریوم‌ها از آب بهمن‌شیر (منبع مورد استفاده در طول دوره) استفاده و غذادهی و تعویض آب به صورت روزانه انجام شد.

[1] Biometery
[2] Total length
[3] Total length
[4] Carapase length

۳-۲- اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

شاخص‌های رشد تیمارهای آزمایشی به صورت ماهانه و براساس رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شدند (Salas-Leiton et al 2010, 28).

میزان رشد حاصله[1] (BWG)

$$BWG = BW_f - BW_{i/}\ BW_i \times 100$$

BWG: درصد افزایش وزن بدن

BW_f: وزن نهایی (گرم)

BW_i: وزن اولیه (گرم)

میزان رشد ویژه[2] (SGR)

$$\%SGR = \frac{LnW_f - \mathrm{Ln}\ W_i}{t_2 - t_1} \times 100$$

W_f: وزن نهایی (گرم)

W_i: وزن اولیه (گرم)

$(t_2 - t_1)$: تعداد روزهای آزمایش

میزان رشد نسبی[3] (RGR)

$$RGR = W_{f-}\ W_{i/}\ W_i \times 100$$

W_f: وزن نهایی (گرم)

W_i: وزن اولیه (گرم

ضریب تبدیل غذایی[4] (FCR)

$$FCR = \frac{F}{W_f - W_i}$$

F : غذای مصرفی (وزن خشک به گرم)

[1] growth Body weight
[2] Specific growth rate
[3] Relative growth rate
[4] Feed Conversion ratio

میزان کارآیی پروتئین Protein efficiency ratio (PER)

$$PER = \frac{BW_f - BW_i}{AP}$$

BW_f: وزن نهایی (گرم)

BW_i: وزن اولیه (گرم)

AP: پروتئین مصرفی

درصد میزان بقا[1] (SR)

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

N_t = تعداد نمونه‌ها در انتهای دوره آزمایش

N_0 = تعداد نمونه‌ها در ابتدای دوره آزمایش

۳-۳- تعیین فعالیت آنزیم‌های پانکراسی

جهت ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها و ویتامین C بر آنزیم‌های پانکراسی، فعالیت ۵ آنزیم آلفا-آمیلاز (Bernfeld 1951, 149; Worthington 1991, 80)، تریپسین (Erlanger et al 1961, 95)، کیموتریپسین (Hummel 1959, 37) و لیپاز (به روش تیتراسیون، Worthington 1991, 80) و پروتئاز قلیایی (Anson 1938, 22) در انتهای دوره مورد سنجش قرار گرفت. برای این‌کار نمونه‌های منجمد شده، سریعاً پس از خارج شدن از تانک ازت مایع با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید و قبل از ذوب شدن کامل، به نسبت ۱ به ۹ (w/v) با بافر همگن‌سازی (Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد با pH =۷/۸) مخلوط شده، نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (مدل D 500) هموژن شدند (Cahu et al 1999, 171; Rungruangsak et al 2002, 82). سپس محصول همگن شده به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Z36HK) در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. در نهایت از مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد.

از آن‌جایی‌که محاسبه دقیق مقدار بافت و یکسان‌سازی آن، بین نمونه‌های مختلف عملاً دارای دقت کامل نمی‌باشد، لذا فعالیت آنزیم بر اساس واحد در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه ($U/mgprotein.min^{-1}$) به عنوان فعالیت اختصاصی یا فعالیت ویژه[1] بیان شد.

[1] Survival rate%

۳-۳-۱ استخراج آنزیم روده‌ای

برای استخراج آنزیم روده‌ای، فسفاتاز قلیایی تام از بافر سرد تریس مانیتول (Manitol ۵۰ میلی‌مولار، بافر Tris–HCl ۲ میلی‌مولار در pH= ۷) استفاده گردید. برای این‌کار نمونه به نسبت ۱:۳۰ (وزنی- حجمی) در بافر فوق رقیق گردید، سپس ۱۰۰ میکرولیتر $Cacl_2$ ۰/۱ مولار به محصول هموژن شده اضافه شده و ۱۰ دقیقه در g ۹۰۰۰ سانتریفوژ شده و مایع رویی جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید (Cahu et al 1999, 171; Crane et al 1979, 554).

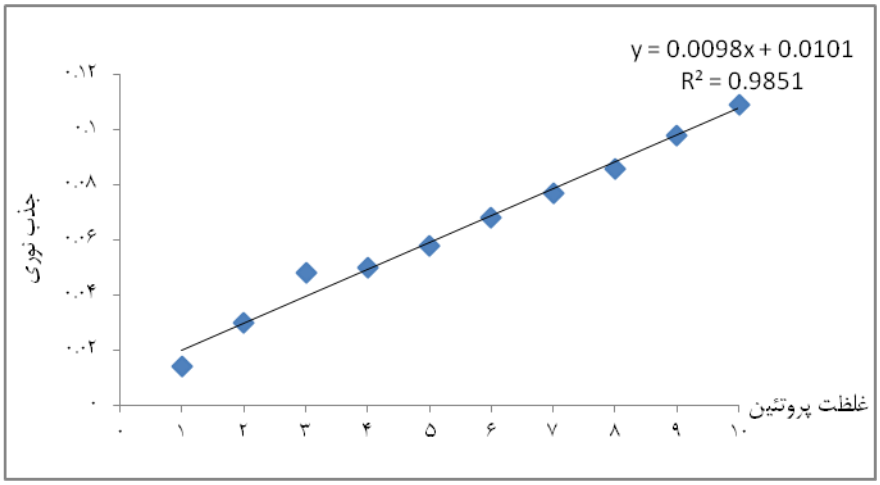
۳-۳-۲ سنجش غلظت پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده

پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده به روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد. به این منظور از آلبومین سرم گاوی (BSA)[2] به عنوان استاندارد استفاده گردید. به منظور تهیه‌ی محلول برادفورد، ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم ماده شیمیایی کوماسی بلو را در ۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۵ درصد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد حل نموده و حجم محلول به دست آمده با به کارگیری آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول توسط کاغذ فیلتر واتمن نمره ۱ فیلتر شده و دور از نور تا زمان سنجش آنزیمی در یخچال نگه‌داری گردید. جهت سنجش پروتئین محلول ابتدا منحنی استاندارد تهیه گردید. جهت ترسیم این منحنی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، ابتدا محلول اولیه از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر فراهم شد، سپس رقت‌هایی متفاوت از آلبومین سرم گاوی (۲۰، ٤٠، ٦٠، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) تهیه گردید (جدول ۳-۲). هر یک از غلظت‌ها با ۳ تکرار تهیه شد و در نهایت یک میلی‌لیتر معرف برادفورد به هر کدام افزوده شد. سرانجام این محلول با طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردیده و منحنی استاندارد رسم گردید (نمودار ۳-۱).

جدول۳-۲: غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی

غلظت‌های BSA (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
بافر فسفات ۰/۱ مولار (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	۱۰۰	۸۰	۶۰	۴۰	۲۰	۰
آلبومین سرم گاوی (میکروگرم/ میلی‌لیتر)	۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰

[1] specific activity
[2] Bovine serum albumine



نمودار ۳-۱ : نمودار منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی. محور X: غلظت پروتئین (µg/ml)، محور Y: جذب نوری[1]

۳-۳-۳ سنجش فعالیت آنزیم تریپسین

برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسین از سوبسترای N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. این سوبسترا تحت تأثیر آنزیم تریپسین تجزیه و به N- بنزوئیل-L- آرژنین تبدیل می‌شود. برای این‌کار ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰ میکرولیتر از اسید کلریدریک ۱ میلی‌مولار مخلوط، سپس برای هم دمایی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد ۳۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده (به نسبت ۱ به ۲۰) به محلول فوق اضافه گردید و دانسیته‌ی نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل 2802 UV) در طول موج ۲۵۳ نانومتر در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم تریپسین بر حسب تغییر میزان جذب، به دنبال شکستن BAEE در مدت ۱ دقیقه از فرمول زیر محاسبه شد (Worthington 1991, 80).

$$\text{میزان پروتئین (mg) / فعالیت آنزیمی (U)} = \frac{\text{فاکتور رقت(۲۰)} \times \{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه (۲۵۳nm)}\}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)} \times ۱۰}$$

[1] optical absorption

۳-۳-۴ سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین

برای تعیین فعالیت آنزیم کیموتریپسین از بنزوئیل-L- تیروزین اتیل استر (BTEE) به عنوان سوبسترا استفاده گردید. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم کیموتریپسین تجزیه و به N- بنزوئیل-L- تیروزین و اتانول تبدیل می‌شود. برای این‌کار ابتدا ۱/۴ سی‌سی از محلول سوبسترا، به ۱/۵ سی‌سی بافر تریس در لوله آزمایش اضافه شد و در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۴ تا ۵ دقیقه برای هم دمایی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم کیموترپپسین، بر اساس مقدار آنزیم که یک میکرومول BTEE در مدت ۱ دقیقه هیدرولیز می‌کند، از فرمول زیر محاسبه شد (Erlanger et al 1961, 95).

$$\text{فعالیت آنزیمی (U)} = \text{میزان پروتئین (mg)} / \frac{\text{۱۰۰۰} \times \text{فاکتور رقت(۲۰)} \times \{\text{جذب شاهد} - \text{(۲۵۶nm) میانگین جذب نمونه}\}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)} \times ۹۶۴}$$

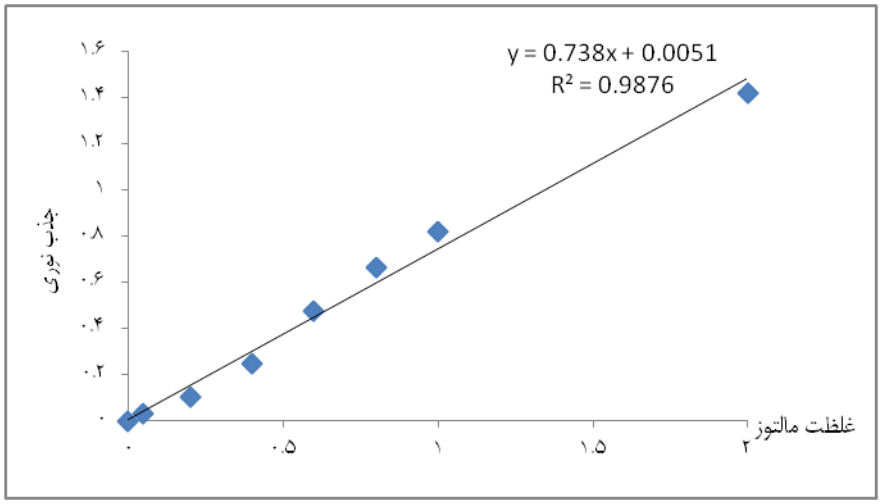
۳-۳-۵ سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده گردید. در این واکنش نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که میزان تولید مالتوز در واحد زمان در حضور معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید و با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز سنجیده می‌شود.

برای تعیین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی رقیق شده (با نسبت۱:۲۰) با آب مقطر سرد و ۲۵۰ میکرولیتر از نشاسته ۱ درصد به یک لوله آزمایش و ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲۵۰ میکرولیتر از نشاسته ۱ درصد نیز به لوله دیگری به عنوان شاهد اضافه شد. لوله‌ها ۳ دقیقه در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد تا به دمای تعادل برسند. بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و هر دو لوله به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن،۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به لوله‌ی شاهد اضافه و سپس لوله‌ها در دمای اتاق خنک شدند و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید. محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری مشاهده شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته (نمودار ۳-۲) و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به دست آمد. واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، بر حسب میلی‌گرم مالتوز آزاد شده تحت اثر

آنزیم آلفاآمیلاز در مدت ۳ دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین از طریق فرمول زیر محاسبه شد (Bernfeld 1951, 149; Worthington 1991, 80) (شکل ۳-۲).

$$\text{فعالیت آنزیمی (U)} = \text{میزان پروتئین (mg)} \times \text{فاکتور رقت} \times \frac{\text{میزان مالتوز آزاد شده } (\mu\text{ mol})}{\text{مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)} \times \text{میزان پروتئین در نمونه (mg)}}$$



نمودار ۳-۲: منحنی استاندارد مالتوز



(ب) (الف)

شکل ۳-۲: الف) استاندارد پروتئین ب) استاندارد مالتوز

۳-۳-۶ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید . در این روش از امولسیون روغن زیتون به عنوان سوبسترا استفاده گردید. سوبسترا تحت تأثیر آنزیم لیپاز تجزیه و به دی‌گلیسرید و اسید

چرب تبدیل می‌شود. بدین منظور روغن زیتون آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم نیاز به بافر ۰/۸ مولار Tris-Hcl، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ میلی‌مولار و معرف تیمول‌فتالئین ۰/۹ درصد بود. برای این‌کار دو لوله آزمایش T[1] و B[2]، ۱/۵ میلی‌لیتر امولسیون روغن زیتون، ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر تریس اضافه و مخلوط گردید. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی جدا شده به درون لوله T ریخته شد و هر دو لوله ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا در این مدت عمل هضم چربی‌ها توسط لیپاز صورت گیرد. به صورت جداگانه ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی از قبل تهیه شده را در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و علامت B بر روی آن نوشته شد و بلافاصله به درون یخچال قرار داده شد تا خنک شود. بعد از اتمام مدت زمان انکوباسیون درون بن‌ماری محتویات لوله B به ارلن مایر داخل یخچال و محتویات لوله T به ارلن مایر دیگری (T) انتقال داده شد. سپس لوله‌های آزمایش با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به خوبی شسته و روی ارلن‌های مربوطه ریخته و مخلوط شد. سپس به هر ارلن ٤ قطره معرف تیمول فتالئین اضافه شد و سپس در یک بورت تمیز محلول هیدروکسید سدیم ریخته و تا ایجاد رنگ آبی روشن بر روی هریک از ارلن‌ها تیتراسیون انجام گرفت (شکل ۳-۳) و میزان هیدروکسید سدیم مصرفی ثبت شد و میزان فعالیت لیپاز از طریق تفریق میزان میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم مصرف شده برای ارلن T و B بدست آمد.

حاصل این تفریق میزان میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم ۵۰ میلی‌مولار در لیتر است که برای خنثی‌سازی اسیدهای چرب آزادشده از لیپیدها در زمان ۳۰ دقیقه انکوباسیون استفاده شده است. یک واحد فعالیت آنزیم، مقداری از آنزیم که یک میکرواکی‌والان اسید چرب را از یک مول تری‌گلیسرید در مدت یک‌ساعت هیدرولیز می‌کند، بیان می‌شود. بنابراین تفاضل دو عدد B و T مقدار عددی فعالیت آنزیم است (واحد مرسوم). فاکتور تبدیل واحد متداول (مرسوم) به واحد بین‌المللی به شرح زیراست :

$$\text{میزان پروتئین (mg)} / \text{فعالیت آنزیمی (U)} = \text{فاکتور رقت} \times \frac{\text{مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)} \times ۲ \times (\text{میلی‌لیتر بلانک شاهد-میلی‌لیتر بلانک نمونه})}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)}}$$

[1] Test
[2] Blank



(ب) (الف)

شکل ۳-۳: الف) امولسیون روغن زیتون ب) افزودن معرف تیمول فتالئین

۳-۳-۷ سنجش فعالیت پروتئاز

فعالیت پروتئاز کل بر اساس روش Anson (۱۹۳۸) با کمی تغییر تعیین گردید. بدین صورت که از کازئین به عنوان سوبسترا استفاده شد (کازئین ۲ درصد در تریس ۰/۰۵ مولار). برای این کار ۱ گرم کازئین در ۴۰ میلی لیتر آب با دادن حرارت و هم زدن ملایم به مدت ۲۰ دقیقه حل شد. سپس ۱ میلی لیتر سود ۱ نرمال و ۲/۵ میلی‌لیتر تریس ۱ مولار به آن اضافه شد. با استفاده از اسید فسفریک pH آن در ۷/۸ ثابت شد. سپس به حجم ۵۰ میلی‌لیتر با افزودن آب رسانده شد.

محلول فعال کننده آنزیم، کلریدکلسیم ۰/۰۱ مولار است که باید تا قبل از استفاده در دمای پایین نگهداری شود. هم‌چنین به تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد نیاز است. جهت ایجاد استاندارد تیروزین، ۱۰ میلی‌لیتر با غلظت ۱۰ میکرومول/میلی‌لیتر تیروزین در آب حل شد، حرارت داده شده تا کاملاً حل شود. سپس در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت انجام آزمایشات نگهداری گردید.

در لوله‌های آزمایش، ۱ میلی‌لیتر بافر–سوبسترا، ۲۰ میکرولیتر کلریدکلسیم ۰/۰۱ مولار و ۵۰ میکرولیتر آنزیم اضافه شد. ۲ لوله آزمایش به عنوان بلانک و ۴ لوله آزمایش برای استاندارد تیروزین با ۱ میلی لیتر لیتر بافر سوبسترا و ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر محلول استاندارد تیروزین اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. با افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول TCA ۵ درصد واکنش متوقف شد. لوله‌ها به خوبی هم زده و در دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از هر لوله ۱ میلی‌لیتر از لایه رویی لوله‌ها برداشته و وارد لوله‌های آزمایش دیگری شد. به هر لوله ۲ میلی‌لیتر سود ۰/۵ مولار اضافه و هم زده شده، سپس ۱ میلی‌لیتر معرف فولین (Folin-Ciacalteu reagent) به آن افزوده شده و پس از ۱۰ دقیقه در طول موج ۶۵۰ نانومتر قرائت شد. قرائت نوری مشاهده

شده در منحنی استاندارد تیروزین قرار گرفته و میزان فعالیت آنزیم پرتئاز به ازای میلی‌گرم پروتئین از از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت آنزیمی (U)} = \frac{\text{میزان تیروزین آزاد شده } (\mu\ mol)}{\text{مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)} \times \text{میزان پروتئین در نمونه (mg)}} \times \text{فاکتور رقت}$$

۳-۳-۸ سنجش فعالیت فسفاتاز قلیایی

جهت سنجش این آنزیم از کیت آلکالین‌فسفاتاز (Zist Chem. Ref: ۱۰-۵۰۳) استفاده شد. مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از بافر بی‌کربنات را با ۱۰۰ میکرولیتر معرف Par-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط شد و ۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده به آن اضافه گردیده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه شد تا واکنش متوقف شود و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. Para-nitrophenylphosphate تحت آنزیم فسفاتاز قلیایی به پارانیترفنول، هیدرولیز می‌شود. شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله آزمایش اضافه گردید.

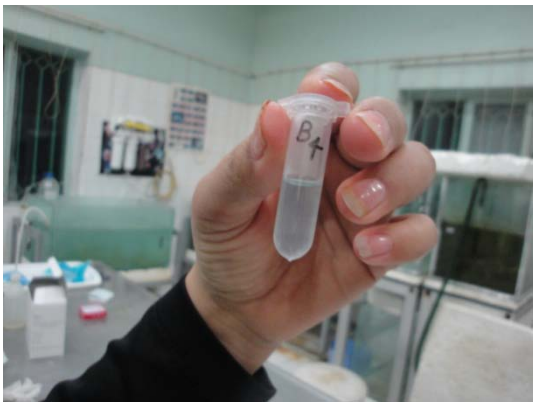
تغییر میزان جذب ×۱۰۰۰ = فعالیت آنزیمی

جذب شاهد – جذب نمونه = تغییر میزان جذب

۳-٤- ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها و ویتامین C بر سیستم ایمنی

۳-٤-۱ همولنف‌گیری

به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌ها و ویتامین C بر سیستم ایمنی، ابتدا نیاز به همولنف بود. بدین منظور در پایان دوره‌ی صد روزه‌ی پرورش، همولنف ۳۰ قطعه میگو از هر تیمار از حفره سینوس شکمی[1] با استفاده از سوزن نازک و سرنگ انسولین ۱ میلی‌لیتری خارج و جهت جلوگیری از لخته شدن با محلول آنتی-کواگولانت[2] (۲۷ میلی‌مول سیترات سدیم[3]، ۳۳۶ میلی‌مول NaCl، ۱۱۵ میلی‌مول گلوکز و ۹ میلی‌مول EDTA[4] با pH=۷ و دمای ۸ درجه‌ی سانتی‌گراد) به نسبت ۱: ۲ (v/v) ترکیب شدند. سپس این مخلوط در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ×۳۰۰ سانتریفیوژ گردید (Vargas-Albores et al 1993, 106). پس از سانتریفیوژ، لایه‌ی رویی جدا شده و جهت انجام آزمایش‌های سرمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۳-۴). سپس در انتهای دوره میزان لیزوزیم همولنف، میزان پروتئین کل و گلوبولین سرم و نیز فعالیت فنول اکسیداز اندازه‌گیری گردید.



شکل ۳-۴: همولنف میگوی وانامی پس از آماده‌سازی

[1] ventral-sinus cavity
[2] Anticoagulant
[3] Sodium Citrate
[4] Ethylene diamine tetra acetic acid

۳-٤-۲ اندازه‌گیری لیزوزیم همولنف

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط Ellis (۱۹۹۰) و Nayak (۲۰۱۰) توصیه شده است، استفاده گردید. بدین منظور، در ابتدا ۱۵ میکرولیتر همولنف با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیکوس (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت ۹٦ خانه‌ای الایزا مخلوط‌گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ٦ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ٤۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۳-۵). میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید (Nayak et al 2008, 5).



شکل ۳-۵: اضافه نمودن سرم خون به باکتری میکروکوکوس و دستگاه الایزاریدر

۳-٤-۳- اندازه‌گیری پروتئین کل و گلوبولین پلاسما

غلظت گلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Nayak و دیگران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه 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 شد.

۳-۴-۴- اندازه‌گیری فعالیت فنول‌اکسیداز[1]

فعالیت فنول‌اکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر با تشکیل رنگدانه DOPA-chrome، پس از اکسیداسیون سوبسترا[2] L-DOPA (Sigma) تعیین شد. به‌طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر از همولنف در پلیت‌های ۹۶ چاهکی قرار گرفته، سپس ۳۰ میکرولیتر از بافر کاکودیلات (CAC) و۵۰ میکرولیتر آنزیم محرک تریپسین (۱ درصد) (Sigma) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن ۱۳۰ میکرولیتر بافر کاکودیلات و ۵۰ میکرولیتر L-DOPAی ۵ میلی‌مول افزوده شده و میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. تشکیل DOPA-chrome پس از ۰، ۵ و ۱۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. هر واحد از فعالیت آنزیمی معادل تغییر در ۰/۰۰۰۱ در جذب/دقیقه/میلی‌گرم از پروتئین در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی گراد است (Söderhäll and Hall 1984, 797). هر آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

۳-۵- چالش باکتریایی

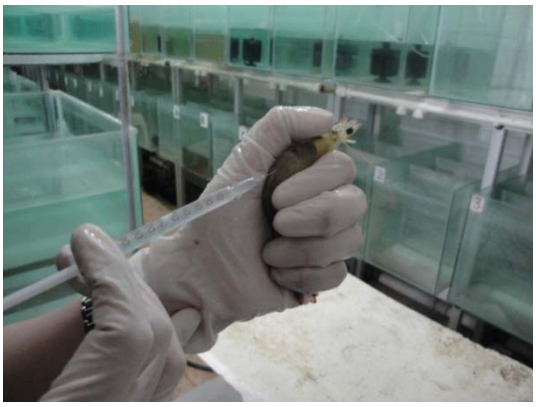
۳-۵-۱ محاسبه LD_{50}[3]

قبل از انجام مطالعه اصلی طی مراحل زیر میزان کشندگی باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس برای میگوی وانامی محاسبه گردید. برای این‌کار ویبریو پاراهمولیتیکوس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در محیط کشت TCBS کشت داده شد. پس از آن محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب ته لوله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو گردید. سپس به باکتری‌ها آن قدر سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا کدورتی معادل لوله شماره‌ی ۱۰ مک‌فارلند (۳×۱۰^{۹} CFU/ml) حاصل شود. سوسپانسیون حاصل به نحوی رقیق گردید تا سوسپانسیون‌های ۱×۱۰^{۵} تا ۱×۱۰^{۸} به دست آمد. از هر رقت از باکتری به ۱۵ قطعه میگوی وانامی با وزن حدود ۲۰ گرم تزریق و با استفاده از نرم‌افزار Probit، اقدام به محاسبه LD_{50} گردید (Alishahi et al 2010, 4). سپس به تیمارهای مورد مطالعه، غلظت محاسبه شده تزریق گردید.

[1] Phenoloxidase
[2] 3,4-dihydroxy L-phenilalanine
3 Lethal Dose 50%

۳-۵-۲ انجام چالش

پس از مشخص شدن LD_{50} باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس برای میگوهای وانامی، پس از پایان دوره‌ی ۱۰۰ روزه تغذیه با پروبیوتیک‌های تحقیق و ویتامین C، ۱۵ قطعه میگو با دوز ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات بعد از ٤ روز (LD_{50} ۹٦ ساعته) باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس به عضله میگو تزریق شد (شکل ۳-٦)، مورد چالش قرار گرفته و علائم ایجاد بیماری، روند پیشرفت بیماری و میزان تلفات در تیمارهای مختلف طی ۱۰ روز پس از چالش مورد برررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از ایجاد بیماری ویبریوزیس ناشی از ویبریو پاراهمولیتیکوس، از بافت هپاتوپانکراس میگوهایی که در حال مرگ بودند، نمونه برداشته و بر روی محیط کشت TCBS کشت انجام شد.

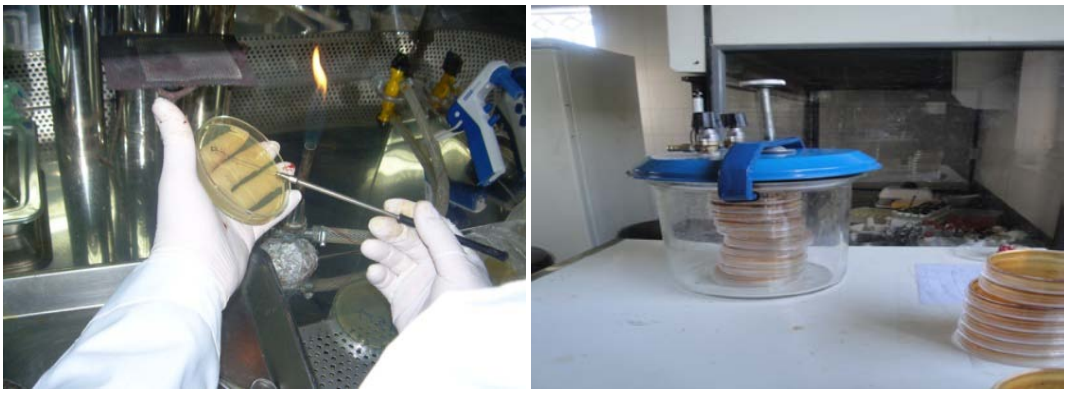


شکل ۳-۶: تزریق باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

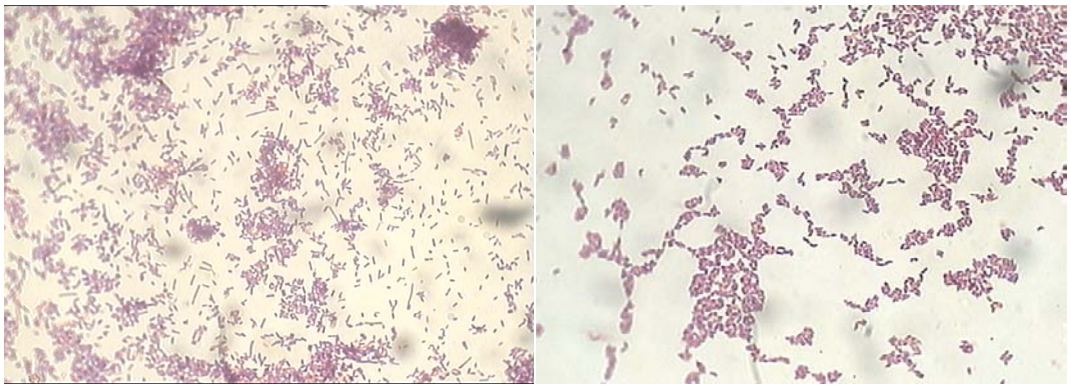
۳-٦- شمارش تام باکتری‌ها

نمونه‌گیری از فلـور میکروبـی روده در انتهـای دوره پـس از غـذادهی بـا جیـره‌هـای حـاوی بـاکتری‌هـای پروبیوتیکی و ویتامین C صورت گرفت. برای نمونه‌گیری ابتدا میگوها از آب خارج شـده و پـس از مـرگ، سطح بدن آن‌ها با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شد. پس از جدا کردن پوسته، ناحیه پشتی میگوها بـا اسـتفاده از اسکالپل استریل باز و روده نمونه‌ها با حرکت ملایم تیغ اسکالپل خارج گردید. یک گرم از این محتویـات روده در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی رقیق شد. از نمونه فوق، رقت‌های متوالی $۱۰^{۲}$ تا $۱۰^{۵}$ تهیه گردیـد و بـه صورت سطحی در محیط کشت MRS Agar و TSA به ترتیب برای شمارش لاکتوباسیلوس‌هـا و شـمارش کلی کشت داده شد. پلیت‌های MRS به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در جار بی‌هـوازی قرار داد شدند (شکل ۳-۷). پس از انکوباسیون، کلونی‌ها شمارش شده و تعداد کل بـاکتری‌هـا بـا احتسـاب

رقت مورد استفاده مشخص گردید (Mahious et al 2005, 14). در شکل ۳-۸ باکتری‌هـای لاکتوباسـیلوس کشت داده شده در زیر میکروسکوپ نوری آورده شده است.



شکل ۳-۷: جار بی‌هوازی و کشت فلور باکتریایی روده



شکل ۳-۸: باکتری‌های لاکتوباسیلوس در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی۱۰۰۰برابر

۳-۷- بافت‌شناسی روده[1]

۳-۷-۱ نمونه‌برداری

سطح بدن ۱۰ میگو از هر تیمار با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شد. پس از جدا کردن پوسته، ناحیه پشتی میگوها با استفاده از اسکالپل استریل باز و روده نمونه‌ها با حرکت ملایم تیغ اسکالپل خارج گردید.

[1] Histology

۳-۷-۲ مراحل آماده سازی بافت

به منظور جلوگیری از تغییرات سلولی حاصل از اتولیز[1] و فساد سلولی[2]، نمونه‌ها در ظروف استریل حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. این مرحله ثبوت[3] نام دارد که حداقل ۲۴ ساعت باید در این ماده قرار بگیرد. جهت زدودن محلول فرمالین، نمونه‌ها حداقل ۵ ساعت با الکل ۵۰ درصد شستشو شدند. با استفاده از دستگاه هیستوکینت[4] مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت لیکا آلمان، مراحل مختلف پاساژ بافتی شامل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی به پارافین انجام گرفت. آب‌گیری[5] با استفاده از الکل‌های ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ و سپس دو الکل ۱۰۰ درصد انجام شد. پس از آن مرحله شفاف کردن[6] (با استفاده از محلول گزیلول)، آغشتگی به پارافین و قالب‌گیری در پارافین[7] انجام گردید. با استفاده از میکروتوم دورانی، برش‌هایی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر از نمونه‌ها تهیه شده و بر روی لام انتقال یافتند. رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H & E) انجام گردید. در این رنگ‌آمیزی هسته به رنگ بنفش تیره یا آبی و سیتوپلاسم و ماده بین سلولی به رنگ صورتی در می‌آید. در انتها جهت بررسی و ساختار اپیتلیال مخاط روده میگوی وانامی از لحاظ تعداد سلول-ها و ضخامت اپیتلیوم، از عدسی چشمی مدرج و میکروسکوپ نوری المپوس[8] استفاده شد (Lightner 1975, 75).

۳-۸- آنالیز شیمیایی ترکیب لاشه

۳-۸-۱ اندازه‌گیری میزان خاکستر

در ابتدا بوته چینی همراه با در آن در کوره الکتریکی به مدت ۱۵ دقیقه سوزانده شد و پس از سرد شدن در دسیکاتور وزن دقیق آن محاسبه گردید. سپس ۵ گرم از گوشت میگو به بوته چینی منتقل گردید و بر روی شعله سوزانده شد، به صورتی‌که نمونه مشتعل نشود و دودی متصاعد نگردد. در مرحله بعد در کوره الکتریکی با حرارت ۵۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳-۲ ساعت حرارت داده شد تا زمانی‌که رنگ خاکستر روشن شود (تیرگی رنگ خاکستر دلیل باقی ماندن کربن در آن است). بوته پس از سرد شدن در داخل

[1] Autolysis
[2] Putrificstion
[3] Fixation
[4] Histokinette
[5] Dehydration
[6] Clearing
[7] Blocking
[8] Olympus

دسیکاتور، دقیقاً وزن شد. این عمل تکرار شد تا دو وزن آخر یکسان شوند و در نهایت درصد خاکستر گوشت با استفاده از رابطه زیر به دست آمد (استاندارد ملی ایران، ٧٤٤).

$$\%A= (m_2 - m_1) \times 100/m_0$$

m_0: وزن نمونه (گرم)

m_1: وزن بوته و در آن (گرم)

m_2: وزن بوته و در با خاکستر (گرم)

۳-۸-۲ اندازه‌گیری رطوبت

در ابتدا ظرف آلومینیومی در دار در داخل آون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۵ درجه‌ی سانتی گراد گذاشته شد و سپس در داخل دسیکاتور خنک گردید و وزن آن محاسبه شد. این عمل تکرار شد تا دو وزن آخر یکسان شوند. در مرحله بعد ۵ گرم از گوشت میگو را در داخل ظرف قرار داده شد و به مدت ۲-۱ ساعت در داخل آون در دمای ۱۰۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس در درون دسیکاتور سرد شد. ظرف پس از سرد شدن در داخل دسیکاتور، دقیقاً وزن شد و این عمل تکرار شد تا دو وزن آخر یکسان شوند. سپس میزان رطوبت با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (پروانه ۱۳۷۷، ۲٤۳).

$$\%W=n\times 100/m$$

W: درصد رطوبت در نمونه

n: کاهش وزن (گرم)

m: وزن نمونه (گرم)

۳-۸-۳ اندازه‌گیری پروتئین

به منظور اندازه‌گیری پروتئین از روش کلدال استفاده شد. در ابتدا ۳/۵ گرم گوشت میگو را در کاغذ صافی وزن نموده و در داخل بالن هضم قرار داده شد. ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۸ گرم کاتالیزور (۹٦ درصد سولفات سدیم، ۳/۵ درصد سولفات مس و ۰/۵ درصد دی اکسید سلنیوم) به آن اضافه شد و بالن را به دستگاه مخصوص هضم کلدال وصل کرده و حرارت داده شد تا مایع بی‌رنگی در ته بالن باقی بماند. در این حالت نمونه کاملاً هضم شده که ۲ ساعت یا مقداری بیش‌تر طول می‌کشد. سپس آن را به وسیله آب مقطر شسته تا تمام نمونه در ته بالن جمع گردد. بالن را سرد نموده و با ٤۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر از راه قیف مربوط چند بار شستشو داده شد تا اطمینان حاصل شود که تمام قسمت هضم شده به بالن وارد شده است. در زیر قسمت سرد کننده یا کندانسور دستگاه تقطیر یک ارلن مایر محتوی ۵۰ میلی‌لیتر اسید بوریک و چند

قطره معرف متیل رد قرار داده شد. سپس از راه قیف دستگاه تقطیر به میزان کافی محلول سود اضافه شد تا محیط قلیایی شود (حدود ۵۰ میلی‌لیتر). بالن حرارت داده شد و عمل تقطیر ادامه یافت تا آمونیاک کاملاً متصاعد گردد و در بالن تقطیر جمع شود. سپس ارلن مایر از زیر دستگاه جدا شد و محلول به‌وسیله اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال خنثی شد. درصد پروتئین از رابطه زیر محاسبه شد (استاندارد ملی ایران، ۹۲٤).

درصد پروتئین =ازت × ٦/۲۵

۳-۸-٤ اندازه‌گیری چربی

در ابتدا ۱۰ گرم نمونه گوشت وزن شده و رطوبت آن گرفته شد، در داخل کاغذ صافی پیچانده و داخل کارتوش قرار داده شد. سپس کارتوش درون بالن سوکسله قرار گرفت. لازم به ذکر است بالن قبلاً به‌مدت ۳۰ دقیقه در آون حرارت دیده بود و پس از خنک شدن در دسیکاتور وزن آن محاسبه شده بود. در مرحله بعد دستگاه سوکسله را نصب کرده و مقداری ان هگزان در داخل اکسترکتور ریخته شد، به‌نحوی که سیفون کند (این کار ٤-۳ بار انجام پذیرفت). سپس مبرد به آن وصل گردید و به‌مدت ۸ ساعت عمل استخراج چربی انجام شد و ان هگزان تبخیر گردید. مجدداً بالن را جدا کرده و روی بن ماری حدوداً ۰/۵ ساعت قرار داده شد تا مابقی ان هگزان تبخیر شد. پس از آن بالن در آون ۱۰۵ درجه به‌مدت یک ساعت قرار گرفت و سپس در دسیکاتور خنک شد و وزن گردید و از رابطه زیر درصد چربی محاسبه شد (پروانه ۱۳۷۷، ۲٤۷):

$$\%L = m_2 - m_1/n$$

L: درصد چربی

m_2: وزن بالن با نمونه

m_1: وزن بالن خالی

n: مقدار نمونه

۳-۹- تجزیه و تحلیل آماری

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

فصل چهارم

تجزیه و تحلیل داده ها

۴-۱- پارامترهای کیفی آب

در طول دوره‌ی پرورش، پارامترهایی نظیر دمای آب، اکسیژن محلول و pH ۲ بار در روز (صبح و عصر) اندازه‌گیری شدند. میزان اکسیژن محلول در طول دوره در حد مناسب بود. روند تغییرات اکسیژن محلول تقریباً ثابت بوده و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف و در ماه‌های نمونه‌برداری مشاهده نشد که قطعاً به علت استفاده از دستگاه‌های هواده به صورت مداوم بود. دمای آب در بین تیمارهای مختلف اختلافی نداشت. این فاکتور در ماه دوم بررسی نسبت به ماه اول افزایش نشان داده، اما در ماه سوم و با توجه به نزدیک شدن به فصل پائیز، دمای آب اندکی کاهش یافت که در تیمارهای مورد آزمایش شرایط یکسان بوده، به‌طوری که بیش‌ترین و کم‌ترین دمای اندازه‌گیری شده در طول دوره به ترتیب در ماه‌های دوم و ماه سوم آزمایش ثبت شد.

فاکتورهای شوری و pH در طول دوره، روند نزولی داشتند. به گونه‌ای که کم‌ترین و بیش‌ترین این پارامترها به ترتیب در ماه‌های سوم و اول اندازه‌گیری شد که در بین تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشتند. بر عکس، مقدار آمونیاک کل در طول دوره روند افزایشی داشت، به‌طوری که کم‌ترین و بیش‌ترین، در ماه‌های اول و سوم نمونه‌برداری به دست آمد. این روند صعودی با توجه به تولید و تجمع مواد مضر حاصل از متابولیسم در طول دوره در استخر قبل توجیه است. چنین شرایطی در تمام تیمارها مشاهده شد که تفاوت معنی‌دار بین تیمار شاهد و سایر تیمارها وجود نداشت. در مجموع در بررسی حاضر، بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در پارامترهای کیفی آب مشاهده نشد. در جدول ۴-۱ میانگین پارامترهای کیفی اندازه‌گیری شده آب در طول دوره بین تیمارهای مختلف ارائه شده است.

جدول ۴-۱: بررسی پارامترهای کیفی آب (Means ±SD) استخرهای پرورش میگوی وانامی در طول دوره آزمایش

پارامترها		اکسیژن محلول (میلی‌گرم لیتر$^{-1}$)	دما (درجه سانتی‌گراد)	شوری (قسمت در هزار)	pH	آمونیاک کل (میلی‌گرم لیتر$^{-1}$)
روز سی‌ام	T.۱	۷/۲±۰/۲۹^{a}	۲۶/۶۶±۱/۹۳^{b}	۲۳/۶±۱/۵۱^{c}	۸/۴۱±۰/۱۵^{c}	۱۰۱/۳۱±۸/۵^{a}
	T.۲	۷/۰±۰/۴۱^{a}	۲۵/۹۲±۱/۹۳^{b}	۲۳/۱±۱/۱۱^{c}	۸/۵±۰/۱۴^{c}	۱۰۴/۳۴۱±۹/۲^{a}
	T.۳	۷/۱±۰/۳۹^{a}	۲۵/۴۲±۱/۴۵^{b}	۲۳/۲۶±۱/۲۱^{c}	۸/۴±۰/۲۵^{c}	۱۰۲/۴۱±۷/۴^{a}
	T.۴	۶/۹±۰/۳۱^{a}	۲۶/۰۵±۱/۵۵^{b}	۲۳/۹±۰/۹^{c}	۸/۵±۰/۱^{c}	۱۰۰±۱۰/۰۱^{a}
روز ششتم	T.۱	۶/۸±۰/۱۶^{a}	۲۷/۷۸±۲/۱۱^{c}	۱۹/۶۸±۱/۵۱^{b}	۸/۲۲±۰/۱۱^{b}	۱۰۴/۱±۷/۵۲^{a}
	T.۲	۷/۰±۰/۲۷^{a}	۲۷/۵۳±۱/۹۶^{c}	۱۹/۰۱±۱/۵۹^{b}	۸/۲±۰/۲۲^{b}	۱۰۵/۱۲±۸/۳۲^{a}
	T.۳	۷/۲±۰/۴۸^{a}	۲۷/۱۹±۲/۰۱^{c}	۱۹/۱۲±۱/۷۱^{b}	۸/۱۷±۰/۳۷^{b}	۱۰۴/۵±۸/۱۸^{a}
	T.۴	۷/۰±۰/۱۹^{a}	۲۸/۰۵±۱/۵۳^{c}	۱۹/۲۳±۱/۲۳^{b}	۸/۲۵±۰/۱۷^{b}	۱۰۲/۱۵±۷/۵۶^{a}
روز نودم	T.۱	۶/۹±۰/۳۷^{a}	۲۵/۱۴±۱/۳۵^{a}	۱۸/۲۳±۱/۰۲^{a}	۸/۱۴±۰/۰۹^{a}	۱۱۰/۰۱±۷/۳۲^{b}
	T.۲	۶/۷±۰/۴۱^{a}	۲۵/۵۵±۱/۳۲^{a}	۱۷/۹۵±۱/۲۵^{a}	۸/۱۵±۰/۱۱^{a}	۱۱۲/۲۱±۹/۸۵^{b}
	T.۳	۶/۸±۰/۵۴^{a}	۲۵/۱۷±۱/۵۱^{a}	۱۸/۱۲±۱/۳۲^{a}	۸/۱۶±۰/۱۵^{a}	۱۱۰/۱±۹/۱۵^{b}
	T.۴	۶/۸±۰/۶۲^{a}	۲۵/۱۷±۲/۰۱^{a}	۱۸/۵±۰/۶۵^{a}	۸/۱۲±۰/۲۱^{a}	۱۰۸/۵۴±۷/۶۱^{b}

*حروف غیرهمنام کوچک در هر ستون، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در میان تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴-۲- نتایج مربوط به ارزیابی رشد و بازماندگی در تیمارها

۴-۲-۱ نتایج مربوط به وزن

۴-۲-۱-۱ میزان رشد روزانه[1]

میانگین افزایش وزن در طول دوره به صورت یکنواخت نبود، به این معنا که کارایی استفاده از پروبیوتیک‌ها، در انتهای دوره اثر خود را نشان داد. نتایج در انتهای سی روز اول نشان داد که کم‌ترین افزایش وزن در تیمار شاهد و تیمار لاکتوکوکوس و بیش‌ترین آن در تیمار پدیوکوکوس به دست آمد (p<۰/۰۵). در روز شصتم، کم‌ترین و بیش‌ترین میانگین افزایش وزن به ترتیب مربوط به تیمارهای ویتامین C و تیمار لاکتوکوکوس بودند. تیمارهای پدیوکوکوس و شاهد نیز در حالت بینابین قراد داشتند. در انتهای دوره کم‌ترین اوزان در به تیمارهای ویتامین C و شاهد و بیش‌ترین در تیمارهای پدیوکوکوس و تیمار لاکتوکوکوس به دست آمد (p<۰/۰۵). در کل استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش وزن و بالطبع ارتقای

[1] Body weight gain

تولید در استخرهای پرورش میگوی وانامی به صورت معنی‌دار شدند. در صورتی که در این آزمایش استفاده از ویتامین C باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار در افزایش وزن نگردید، هر چند که برتری محسوسی در وزن تیمار ویتامین C نسبت به شاهد به دست آمد (p>۰/۰۵). در جدول ٤-۲ نتایج مربوط به نرخ افزایش وزن در استخرهای پرورش میگوی وانامی در طول دوره ارائه شده است.

٤-۲-۱-۲ میزان رشد نسبی[1]

نتایج نرخ رشد نسبی نیز حاکی از تأثیرات مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها در طی دوره پرورش بود. بدین صورت که در انتهای سی روی اول آزمایش، این فاکتور به ترتیب در تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس بیش‌ترین اندازه و کم‌ترین آن در تیمارهای ویتامین C و شاهد اندازه‌گیری شد (p<۰/۰۵). میانگین این فاکتور در سی روز دوم نشان داد که بیش‌ترین میزان رشد نسبی در تیمارهای پروبیوتیکی به دست آمد، به این صورت که بیش‌ترین آن در تیمار لاکتوکوکوس و پس از آن تیمار پدیوکوکوس به دست آمد (p<۰/۰۵). کم‌ترین مقدار نرخ رشد نسبی نیز در تیمار ویتامین C ثبت شد، به گونه‌ای که حتی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). در انتهای دوره، بیش‌ترین میزان رشد نسبی در تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس محاسبه گردید (p<۰/۰۵)، در حالی که تیمارهای شاهد و ویتامین C بدون اختلاف معنی دار با همدیگر در ردیف دوم قرار گرفتند (p>۰/۰۵) (جدول ٤-۲).

٤-۲-۱-۳ نرخ رشد ویژه[2]

نتایج نرخ رشد ویژه نیز مشابه افزایش وزن و نرخ رشد نسبی به دست آمد. به این صورت که پایان روز سی‌ام، تیمارهای پدیوکوکوس و شاهد بیش‌ترین و کم‌ترین میانگین نرخ رشد ویژه را نشان دادند (p<۰/۰۵). در روز شصتم، بیش‌ترین این فاکتور در تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس و کم‌ترین آن در تیمار ویتامین C به دست آمد. تیمار شاهد نیز در حالت بینابین قرار گرفت (p<۰/۰۵). در انتهای دوره، تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس (بدون اختلاف معنی‌دار) دارای بهترین نتایج و تیمارهای شاهد و ویتامین C (بدون اختلاف معنی‌دار) در جایگاه بعدی قرار گرفتند (p<۰/۰۵) (جدول ٤-۲).

[1] Relative growth rate
[2] Specific growth rate

٤-٢-١-٤ نرخ کارایی پروتئین[1]

نتایج کارایی پروتئین در این بررسی نشان داد که در روز سی‌ام آزمایش، تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس و پس از آن تیمار ویتامین C دارای بهترین کارکرد بود. تیمار شاهد نیز کم‌ترین نرخ کارایی پروتئین را نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین این عامل در روز شصتم، نیز نشان دهنده تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در پرورش میگو بود، به این صورت که بیش‌ترین کارایی پروتئین در تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس و کم‌ترین در ویتامین C به دست آمد، تیمار شاهد نیز در حالت بینابین قرار گرفت (p<۰/۰۵). بهترین نتایج در سی روز انتهایی در تیمارهای پروبیوتیکی حاصل شد. کم‌ترین نرخ کارایی پروتئین در تیمار شاهد و تیمار ویتامین C در حالت بینابین قرار گرفت (p<۰/۰۵) (جدول ٤-٢).

٤-٢-١-٥ ضریب تبدیل غذایی[2]

در طی این آزمایش، استفاده از پروبیوتیک‌ها و ویتامین C در ارتقای ضریب تبدیل غذایی میگوهای وانامی بسیار موثر بودند. میانگین این فاکتور در سی روز اول بررسی، نشان داد که بهترین نتیجه در تیمار پدیوکوکوس به دست آمد، پس از آن تیمار لاکتوکوکوس و ویتامین C و در انتها تیمار شاهد قرار گرفتند (p<۰/۰۵). در سی روز دوم، بهترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار لاکتوکوکوس و پس از آن تیمار پدیوکوکوس مشاهده شد. تیمارهای ویتامین C و تیمار شاهد نیز بدون داشتن اختلاف معنی‌دار در جایگاه بعدی قرار گرفت. در سی روز انتهایی همچنان بهترین آثار در تیمارهای پدیوکوکوس ولاکتوکوکوس و پس از آن ویتامین C مشاهده شد (p<۰/۰۵). در جدول ٤-٢ نتایج مربوط به تأثیر پروبیوتیک‌ها و ویتامین C را بر فاکتورهای وزن میگوها ارائه شده است.

[1] Protein efficiency rate
[2] Food convertion ratio

جدول ٤-٢: مقایسه شاخص‌های رشد وزنی (Means ± SD) در میگوی وانامی بین تیمارهای مورد بررسی

تیمار	شاخص	وزن نهایی (گرم)	نرخ رشد نسبی	نرخ رشد ویژه	نرخ کارایی پروتئین	ضریب تبدیل غذایی
روز سی‌ام	T.۱	۷/۰۸۷±۰/۰۴^{aA}	۱۷۳/۵۳±۵/۶^{aA}	۳/۳۳±۰/۱۲^{aC}	۲/۵۵±۰/۴۸^{aA}	۲/۰۲±۰/۱۲^{dA}
	T.۲	۸/۱۷±۰/۱۱^{cA}	۲۱۵/۴۴±۷/۱۵^{dA}	۳/۸۳±۰/۱۴^{dC}	۳/۱۷±۰/۵۵^{cA}	۱/۷±۰/۲۵^{aA}
	T.۳	۸/۲۲±۰/۱۷^{aA}	۲۰۷/۵۱±۸/۱۲^{cA}	۳/۷۴±۰/۳۱^{cC}	۳/۱۹±۰/۴۱^{cA}	۱/۸۱±۰/۱۵^{bA}
	T.۴	۷/۹۳±۰/۰۶^{bA}	۲۰۰/۴۱±۴/۵^{bA}	۳/۶۷±۰/۲^{bC}	۲/۷۱±۰/۳۶^{bA}	۱/۹۷±۰/۲۲^{cA}
روز ششتم	T.۱	۱۲/۶۸±۰/۴^{bB}	۳۸۶/۰۵±۱۰/۳^{bB}	۲/۶۴±۰/۳۱^{bB}	۲/۶۶±۰/۵۴^{bB}	۲/۱۷±۰/۴۱^{cB}
	T.۲	۱۲/۶۸±۰/۴^{bB}	۴۳۸/۲۲±۹/۷۸^{cB}	۲/۸۱±۰/۴۱^{cB}	۳/۶۱±۰/۱۴^{cB}	۱/۹۱±۰/۲۵^{bB}
	T.۳	۱۳/۹۴±۰/۳۸^{cB}	۴۵۱/۹۲±۸/۲۵^{dB}	۲/۸۵±۰/۶۵^{cB}	۳/۶±۰/۲۵^{cB}	۱/۸±۰/۲۸^{aB}
	T.۴	۱۱/۸۴±۰/۲۳^{aB}	۳۴۸/۴۸±۱۰/۵^{aB}	۲/۵±۰/۴۶^{aB}	۲/۱۷±۰/۳۵^{aB}	۲/۰۷±۰/۱۴^{cB}
روز نودم	T.۱	۱۶/۶۱±۰/۱۱^{aC}	۵۳۶/۴۳±۶/۴۵^{aC}	۲/۰۶±۰/۰۴^{aA}	۲/۷۱±۰/۱۳^{aC}	۲/۲۱±۰/۱۵^{cC}
	T.۲	۲۰/۰۸±۰/۲۱^{bC}	۶۷۵/۵۵±۷/۸۷^{bC}	۲/۲۸±۰/۰۸^{bA}	۳/۵۱±۰/۱۷^{bC}	۱/۷۳±۰/۱۷^{aC}
	T.۳	۲۰/۰۵±۰/۲۵^{bC}	۶۶۶/۹۲±۹/۲۶^{bC}	۲/۲۶±۰/۲۴^{ba}	۳/۵۴±۰/۱۶^{bC}	۱/۷۱±۰/۵۴^{aC}
	T.۴	۱۶/۸۴±۰/۱۲^{aC}	۵۳۸/۰۳±۸/۱۸^{aC}	۲/۰۶±۰/۰۶^{aA}	۲/۷۵±۰/۰۹^{aC}	۲/۱۵±۰/۱۱^{bC}

*حروف کوچک لاتین غیر همنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها در هر ستون و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین ماه‌های مختلف نمونه‌برداری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

۴-۲-۲ نتایج مرتبط با شاخص‌های طول و نرخ بازماندگی میگوهای وانامی

۴-۲-۲-۱ افزایش طول[1]

در سی روز اول این بررسی کم‌ترین میزان رشد طول مربوط به تیمار ویتامین C بود، هر چند که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت ($p>۰/۰۵$). بیش‌ترین افزایش طول مربوط در تیمار لاکتوکوکوس اندازه‌گیری شد و تیمار پدیوکوکوس مابین این دو قرا گرفت. در سی روز دوم بیش‌ترین افزایش طول در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس محاسبه شد. کم‌ترین میزان رشد طولی در تیمار ویتامین C به دست آمد که با تیمار شاهد نیز اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). در سی روز انتهایی، بیش‌ترین میانگین رشد طول در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس اندازه‌گیری شد. پس از آن تیمار ویتامین C قرار داشته که با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). (جدول ٤-٣)

[1] Total length

٤-٢-٢-٢ طول کاراپاس[1]

بیش‌ترین طول کاراپاس اندازه‌گیری شده در سی روز اول بررسی، مربوط به تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس بود (p<۰/۰۵). بین تیمارهای شاهد و ویتامین C در این مرحله اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در سی روز دوم، بیش‌ترین طول کاراپاس متعلق به تیمار پدیوکوکوس بود. پس از آن تیمار لاکتوکوکوس و ویتامین C بوده که در این مرحله بین این دو اختلاف معنی‌دار نبود. در سی روز انتهایی، نیز بیش‌ترین طول کاراپاس در تیمار پدیوکوکوس و کم‌ترین در تیمار ویتامین C و شاهد به دست آمد (p<۰/۰۵) (جدول ٤-٣).

۴-۲-۲-۳ نرخ بازماندگی[2]

نرخ بازماندگی در میگوهای وانامی در انتهای دوره، در زمان صید از طریق تقسیم محصول برداشت شده بر وزن میانگین هر تیمار محاسبه گردید. بیش‌ترین نرخ بقا در تیمار پدیوکوکوس و پس از تیمار لاکتوکوکوس به دست آمد. ویتامین C نیز دارای اثرات مثبت بر روند تولید بوده و با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. در کل می‌توان اظهار داشت استفاده از مواد مورد استفاده در دوره پرورش بالاخص مصرف پروبیوتیک‌ها دارای اثرات مثبت در روند تولید در واحد سطح و افزایش بازدهی بوده است. در این میان پروبیوتیک پدیوکوکوس بهترین بازده را نشان داده است. در جدول ۴-۳ شاخص‌های طول و نرخ بازماندگی میگوهای وانامی ارائه شده است.

[1] Carapase length
[2] Survival rate

جدول ۴-۳: مقایسه شاخص‌های رشد طولی و بازماندگی (Means ± SD) در میگوی وانامی بین تیمارهای مورد بررسی

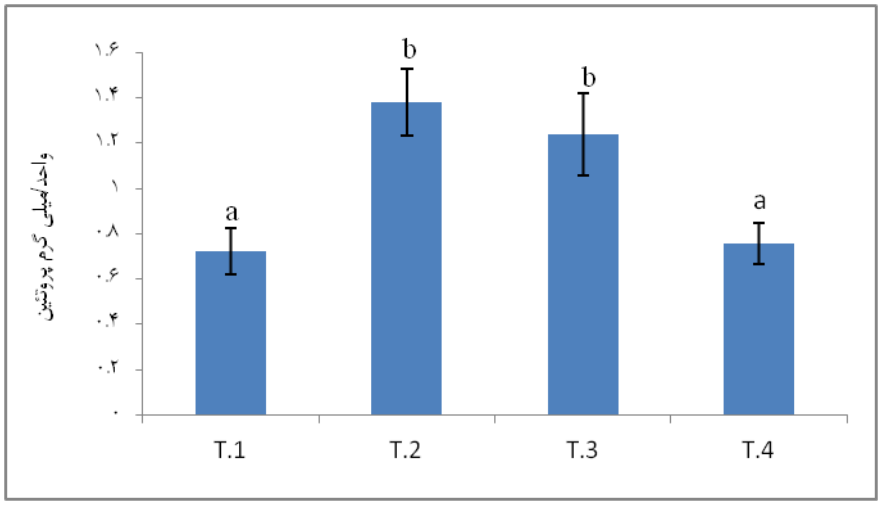
تیمار / شاخص		طول کل (سانتی متر)	طول کاراپاس (سانتی متر)	نرخ بازماندگی
روز سی‌ام	T.۱	۴/۲۷±۰/۲^{aA}	۱/۵۱±۰/۲^{aA}	-
	T.۲	۴/۳۱±۰/۱^{bA}	۱/۶±۰/۳^{cA}	-
	T.۳	۴/۸۹±۰/۱۲^{cA}	۱/۵۵±۰/۲۱^{bA}	-
	T.۴	۴/۲۵±۰/۲۴^{aA}	۱/۴۹±۰/۳^{aA}	-
روز شصتم	T.۱	۹/۰۸±۰/۲۶^{bB}	۱/۹۶±۰/۳^{aB}	-
	T.۲	۹/۸۹±۰/۴۵^{dB}	۲/۱۱±۰/۲^{cB}	-
	T.۳	۹/۵۹±۰/۵۶^{cA}	۲/۰۴±۰/۱۲^{bB}	-
	T.۴	۸/۹۹±۰/۴۵^{aB}	۲/۰۱±۰/۳^{bB}	-
روز نودم	T.۱	۱۳/۳۳±۰/۶۳^{bC}	۲/۵۱±۰/۲^{aC}	۸۴/۱±۴/۱۲^{a}
	T.۲	۱۴/۱±۰/۵۹^{dC}	۲/۷۵±۰/۲^{cC}	۹۱±۳/۵۴^{d}
	T.۳	۱۳/۸۷±۰/۴^{cC}	۲/۶±۰/۲۴^{bC}	۸۹±۲/۱۵^{c}
	T.۴	۱۳/۰۸±۰/۵۶^{aC}	۲/۵۴±۰/۲^{aC}	۸۵/۶±۳/۴۱^{b}

*حروف کوچک لاتین غیر همنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها و حروف بزرگ لاتین غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین ماه‌های مختلف نمونه‌برداری در هر ستون در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

۴-۳- آزمایشات ارزیابی آنزیم‌های گوارشی

۴-۳-۱ بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، تیمارهای پروبیوتیکی پدیوکوکوس (۱/۳۸۱±۰/۱۵) و لاکتوکوکوس (۱/۲٤±۰/۱۸) اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با تیمار شاهد (۰/۷۲۲±۰/۱) داشته‌اند ($p<۰/۰۵$)، ولی تیمار ویتامین C تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد در فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز نشان نداند ($p>۰/۰۵$)، هر چند دارای اندکی افزایش نسبت به تیمار شاهد بود. در کل، بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در میگوهای وانامی در تیمار پدیوکوکوس (۱/۳۸۱±۰/۱۵) به دست آمد. نمودار ۴-۱ میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد.

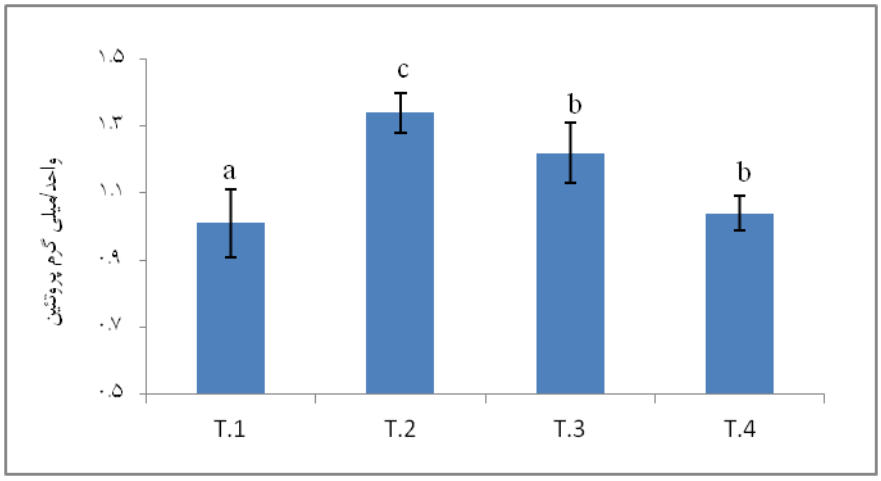


نمودار ۴-۱: مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز (Means ±SD) در تیمارهای چهارگانه.

حروف غیرهمنام، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در میان تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴-۳-۲ بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز

نتایج نشان داد که تیمار پدیوکوکوس بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز (۰/۰۶±۱/۳۴) را داشته که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پس از آن تیمار لاکتوکوکوس (۰/۰۹±۱/۲۲) در جایگاه دوم قرار گرفت. فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمار ویتامین C (۰/۰۵±۱/۰۴) نیز دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (۰/۱±۱/۰۱) بود (P<۰/۰۵)، هر چند میزان به دست آمده از تیمارهای پروبیوتیکی بسیار کم‌تر بود. در نمودار ۴-۲ میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمارهای مختلف ارائه شده است.

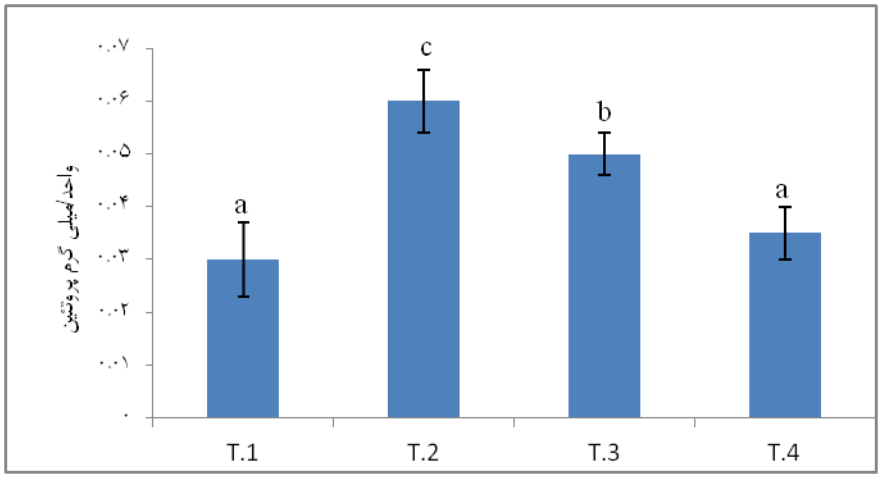


نمودار ۴-۲: مقایسه میزان فعالیت آنزیم پروتئاز (Means ±SD) در تیمارهای مختلف

حروف غیرهمنام، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

٤-٣-٣ بررسی فعالیت آنزیم لیپاز

بررسی حاضر نشان داد که استفاده از مکمل‌های غذایی پروبیوتیک و ویتامین C موجب اثرات قابل توجه در فعالیت آنزیم لیپاز شده است (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که تیمار پدیوکوکوس موثرترین مکمل مورد استفاده بوده است (۰/۰۰۶±۰/۰۶). هم‌چنین آنزیم لیپاز در تیمار لاکتوکوکوس (۰/۰۰۴±۰/۰۵) نسبت به دو تیمار دیگر فعالیت بیش‌تری داشته است (P<۰/۰۵). هر چند استفاده از ویتامین C (۰/۰۰۵±۰/۰۳۵) در جیره غذایی میگوی وانامی، اثر مطلوبی بر روی فعالیت این آنزیم نداشته و با گروه شاهد (۰/۰۰۷±۰/۰۳)، اختلاف معنی داری نشان نداد (p>۰/۰۵) (نمودار ۴-۳).

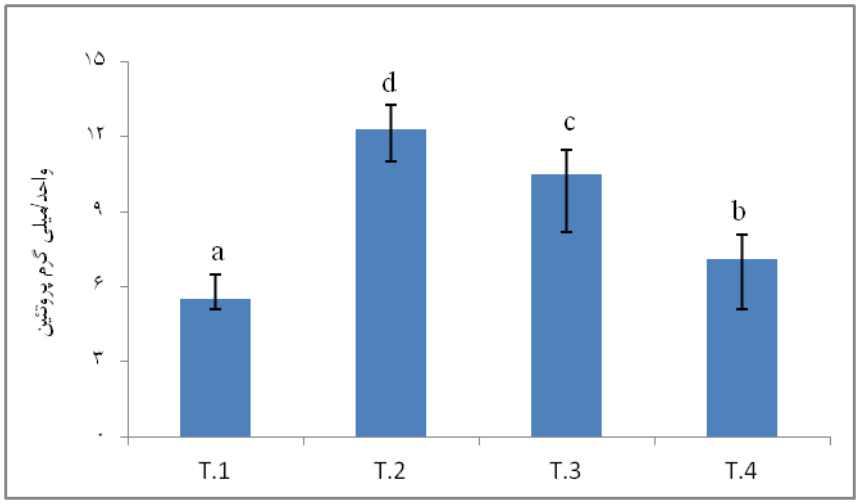


نمودار ۴-۳: مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز (Means ±SD) در تیمارهای مختلف

حروف غیرهمنام، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴-۳-۴ بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آنزیم آلکالین فسفاتاز در انتهای دوره پرورش، در تیمار پدیوکوکوس بیش‌ترین میزان فعالیت را نشان داده (۱/۳±۱۲/۳) و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). این آنزیم در تیمار لاکتوکوکوس (۲/۳±۱۰/۵) نیز پس از تیمار پدیوکوکوس بسیار فعال بوده است. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار ویتامین C (۷/۱±۲) نیز دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (۵/۵±۲) بود (P<۰/۰۵)، هر چند میزان به دست آمده از تیمارهای پروبیوتیکی بسیار کم‌تر بود. در نمودار ۴-۴ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای مختلف ارائه شده است.



نمودار ۴-۴: مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (Means ±SD) در تیمارهای مختلف

حروف غیرهمنام، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴-۳-۵ بررسی فعالیت آنزیم تریپسین

بر اساس آزمایشات انجام شده، در بین تیمارهای مختلف، اختلاف مشخص و معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (p>۰/۰۵)، حتی در تیمار پدیوکوکوس نسبت به سایر تیمارها، فعالیت آنزیم تریپسین اندکی کم‌تر اندازه‌گیری شد، هر چند معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). میزان فعالیت این آنزیم در تیمار پدیوکوکوس ۰/۱۴۱±۰/۰۰۲، در تیمار لاکتوکوکوس ۰/۱۳۹±۰/۰۰۱، در تیمار ویتامین C ۰/۱۴۱±۰/۰۰۳ و در تیمار شاهد ۰/۱۴۲±۰/۰۰۱ به دست آمد.

٤-۳-٦ بررسی فعالیت آنزیم کیموتریپسین

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مکمل غذایی پروبیوتیکی و ویتامین C باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم کیموتریپسین نشده است (p>۰/۰۵). در این آزمایش نیز مانند نتایج آزمایش فعالیت آنزیم تریپسین هیچ اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نگردید. به طور قطع می‌توان بیان کرد که در این بررسی، استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی و ویتامین C، اثر مثبتی را بر روی این دو آنزیم گوارشی مهم نداشته‌اند. در جدول ۴-۴ فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای مختلف ارائه شده است.

جدول ۴-۴ : فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای مختلف

فعالیت آنزیم‌ها (واحد/ میلی‌گرم پروتئین)	تیمار شاهد (T.1)	تیمار پدیوکوکوس (T.2)	تیمار لاکتوکوکوس (T.3)	تیمار ویتامین C (T.4)
تریپسین	۰/۱۴۲±۰/۰۰۱^{a}	۰/۱۴۱±۰/۰۰۲^{a}	۰/۱۳۹±۰/۰۰۲^{a}	۰/۱۴۱±۰/۰۰۳^{a}
کیموتریپسین	۰/۱۷۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۱۷۶±۰/۰۰۲^{a}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{a}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{a}

۴-۴- یافته‌های ایمنی‌شناسی

۴-۴-۱ فعالیت لیزوزیم

در انتهای دوره، فعالیت لیزوزیم همولنف در تیمارهای مختلف محاسبه شد. بر اساس نتایج، بین تیمارها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. می‌توان ابراز نمود که در بررسی حاضر استفاده از پروبیوتیک‌ها و یا ویتامین C 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 ۴-۵ میانگین فعالیت لیزوزیم سرم در در تیمارهای مختلف آزمایش ارائه شده است.

جدول ۴-۵ : میانگین (Means ±SD) فعالیت لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر) همولنف میگوهای وانامی در تیمارهای مختلف

تیمار شاهد (T.1)	تیمار پدیوکوکوس (T.2)	تیمار لاکتوکوکوس (T.3)	تیمار ویتامین C (T.4)
۲۰±۱/۴^{a}	۲۰/۲±۱/۵^{a}	۲۰/۵±۰/۹^{a}	۲۰±۱/۲^{a}

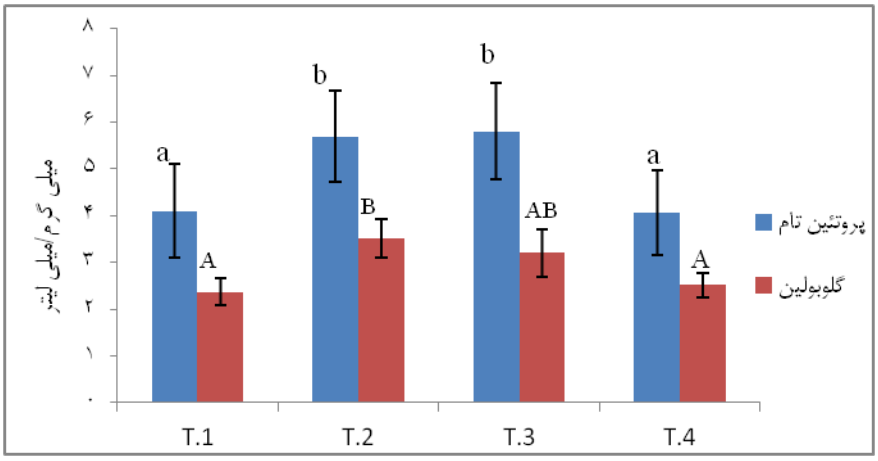
۴-۴-۲ میزان پروتئین تام و گلوبولین همولنف

۴-۴-۲-۱ پروتئین تام

مقدار پروتئین تام همولنف تیمارهای تیمارهای پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با تیمار شاهد و ویتامین C بود ($p<۰/۰۵$)، به طوری که بیش‌ترین مقدار پروتئین در تیمار لاکتوکوکوس (۰/۰۳ ± ۵/۸) اندازه‌گیری شد. تیمار ویتامین C در مقایسه با تیمار شاهد اندکی افزایش نشان داد، هر چند که این اختلاف معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

۴-۴-۲-۲ گلوبولین همولنف

نتایج مربوط به مقایسه میزان پروتئین و گلوبولین همولنف در تیمارهای مورد بررسی در نمودار ۴-۲ آورده شده است. همان‌طور که مشخص است، بیش‌ترین میزان گلبولین تام در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس به دست آمد ($p<۰/۰۵$). مقدار اندازه‌گیری شده این فاکتور ایمنی در تیمار ویتامین C اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت ($p>۰/۰۵$)، هر چند افزایش اندکی در نمونه گروه ویتامین ث مشاهده گردید در نمودار ۴-۵ میزان پروتئین تام و گلوبولین همولنف ارائه شده است.

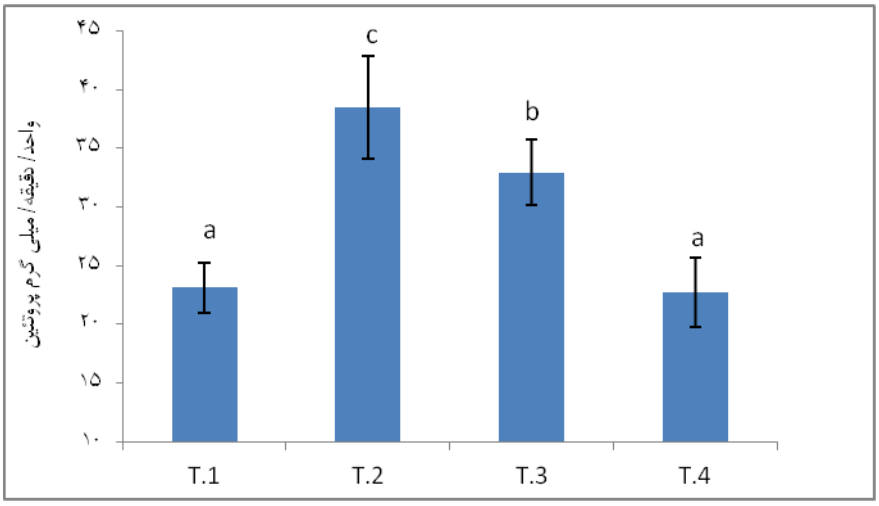


نمودار ٤-٥: نمودار مقایسه (Means ±SD) پروتئین تام و گلوبولین در میگوی وانامی برای تیمارهای چهارگانه

حروف کوچک نشان دهنده تفاوت در میزان پروتئین تام در بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در میزان گلوبولین همولنف برای هر تیمار است.

٤-٤-٢-٣ میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز

نمودار ۴-۶ نتایج میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در گروه‌های تغذیه شده پروبیوتیکی و ویتامین C را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز تیمارهایی که پروبیوتیک دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل و ویتامین C افزایش نشان داده ($p<۰/۰۵$)، به طوری‌که در تیمار پدیوکوکوس بیش‌ترین فعالیت اندازه‌گیری شد، پس از آن تیمار لاکتوکوکوس بود، هر چند از تیمار پدیوکوکوس فعالیت کم‌تری نشان داده است ($p<۰/۰۵$). برای فعالیت این آنزیم در تیمار ویتامین C و تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری ثبت نشد ($p>۰/۰۵$).



نمودار ٤-٦: نمودار میزان فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در میگوی وانامی برای تیمارهای چهارگانه

۴-۵- نتایج چالش باکتریایی

نتایج مربوط به آلوده‌سازی تیمارهای تحقیق با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس در نمودار ۴-۷ آورده شده است.

در دو روز اول پس از چالش، مرگ و میری رخ نداد. برخی از میگوها بی‌حرکت شده، مقدار غذای مصرفی کاهش یافته، نقاطی از بدن به رنگ قرمز در آمده، قسمت‌های انتهایی بدن مخصوصاً دم حالت خوردگی داشته و با بی‌حالی در کناره‌ها و سطح آب حرکت می‌کردند. پاهای حرکتی و شنا به رنگ قرمز مشاهده شدند. ضایعات پوستی شایع در بیماری‌های باکتریایی مانند عفونت‌های موضعی ناشی از وجود زخم‌ها بر سطح بدن، از دست دادن زوائد بدن مانند پاهای شنا و حرکتی، ظهور لکه‌های سیاه و قهوه‌ای بر روی کوتیکول و هم‌چنین نکروز بافت عضله در نقاط مختلف بدن میگوهای مورد چالش به وفور مشاهده شد.

در روز سوم مرگ و میر آغاز شد. بیش‌ترین مرگ و میر در تیمار شاهد روی داد. به گونه‌ای که در روز سوم و چهارم پس از چالش نیمی از میگوها با نشان دادن علائم مذکور از بین رفتند. هم‌چنین در تیمار ویتامین C میزان مرگ و میر به شدت افزایش یافت. تا روز پنجم پس از چالش، کم‌ترین میزان تلفات در تیمار لاکتوکوکوس با ۲۶ درصد تلفات مشاهده شد. در روزهای شش و هفتم، مرگ و میر روند صعودی داشت، به گونه‌ای که در تیمار شاهد بیش از ۷۳ درصد و در تیمار پدیوکوکوس ۴۶ درصد از میگوها با علائم مذکور، تلف شدند. در روزهای هفت و هشتم چالش در تیمار پدیوکوکوس مرگ و میری مشاهده نشد. هر چند در سایر تیمارها، این روند ادامه داشت. در روز دهم چالش، بیش‌ترین بقا در تیمار پدیوکوکوس و پس

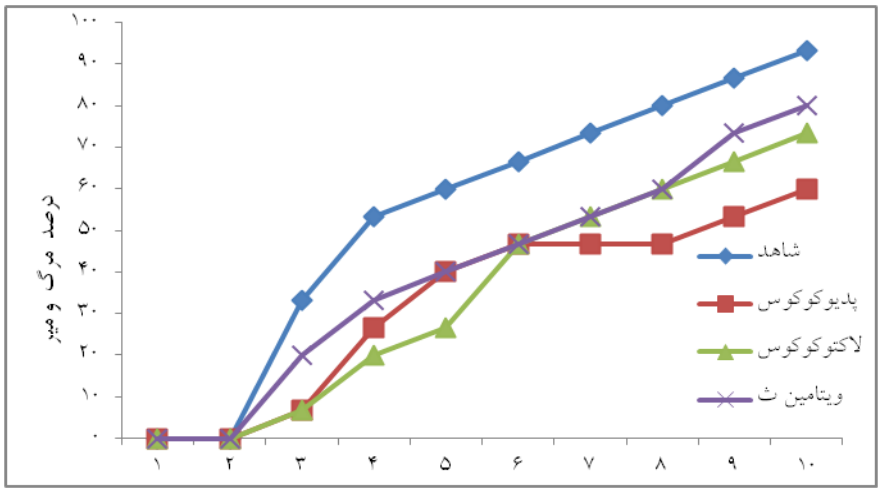
از آن در تیمار لاکتوکوکوس مشاهده شد، هر چند به نظر می‌رسد استفاده از ویتامین C باعث ارتقای سیستم ایمنی شده است، به گونه‌ای که در پایان دوره چالش ۲۰ درصد از میگوها زنده ماندند. گرچه برخی از میگوهایی که زنده ماندند، علائم بیماری را نشان دادند (بیش‌تر خوردگی دم و وجود لکه‌های سیاه و قهوه‌ای بر کوتیکول و زوائد بدن) (شکل ۴-۱). جهت اطمینان از ایجاد بیماری ویبریوزیس ناشی از ویبریو پاراهمولیتیکوس، از بافت هپاتوپانکراس بر روی محیط کشت TCBS انجام شد که این تست حاکی از ایجاد بیماری توسط باکتری مذکور بوده است.



(ب) (الف)

شکل ۴-۱: الف) میگوهای مورد چالش ب) میگوی بیمار

همان‌طور که در نمودار ۴-۷ آمده است، کم‌ترین و بیش‌ترین تلفات به ترتیب در تیمار پدیوکوکوس و تیمار شاهد می‌باشد.



نمودار ۴-۷: تلفات میگوهای وانامی تغذیه شده با پروبیوتیک‌ها و ویتامین C پس از چالش با باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس

۴-۶- آزمایش‌های باکتریایی روده

۴-۶-۱ میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده

نتایج حاصل از بررسی لاکتوباسیل‌های روده میگوهای وانامی بین چهار تیمار مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان داد ($p<۰/۰۵$) و به طور واضح تأثیر پروبیوتیک‌های مختلف بر فلور باکتریایی روده میگوها مشاهده گردید. در این بررسی از این نظر، دو تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد و تیمار ویتامین C داشتند ($p<۰/۰۵$)، به طوری که بیش‌ترین حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس مشاهده شد. هم‌چنین کم‌ترین آن در گروه شاهد به دست آمد.

٤-٦-٢ میزان باکتری‌های کل در روده

در بررسی شمارش کلی باکتری‌های محتوی روده نیز دو تیمار تغذیه شده با پرویوتیک‌ها، اختلاف معنی‌داری با شاهد و تیمار ویتامین C داشتند ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین تعداد باکتری مربوط به تیمار پدیوکوکوس بود. بررسی نتایج حاصل از آزمایشات باکتریایی نشان داد میزان باکتری‌ها حتی در تیمار ویتامین C بیش‌تر از شاهد بود، ولی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در جدول ۴-۶ تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک در بافت روده ارائه شده است.

جدول ۴-۶: مقایسه تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک (Means ±SD) در بافت روده برای تیمارهای چهارگانه

آزمایشات باکتریایی	شاهد (T.1)	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (T.2)	لاکتوکوکوس لاکتیس (T.3)	ویتامین C (T.4)
تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک ($CFU^{۲}۱۰$)	۹/۱۲ ±۰/۹۳^{a}	۳۱/۸۳ ±۳/۱۸^{c}	۲۶/۱۹ ±۲/۴۸^{b}	۱۲/۰۳ ±۱/۲۶^{a}
تعداد باکتری‌های کل روده ($CFU^{۵}۱۰$)	۱۹/۴۲ ±۲/۲۷^{a}	۷۲/۳۱±۵/۰۱^{c}	۶۳/۷۴ ±۴/۱^{b}	۱۸/۶۵ ±۳/۵۱^{a}

*حروف کوچک نشان دهنده تفاوت در میزان در باکتری‌های اسیدلاکتیک در بین تیمارها و حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در میزان کل باکتری های روده بین تیمارها است.

۴-۷- هیستولوژی بافت روده

نتایج بافت‌شناسی روده تأثیر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها را در افزایش تعداد سلول‌های انتروسیت و ضخامت اپیتلیوم روده و در نتیجه افزایش هضم و جذب مواد غذایی را نشان می‌دهد. این امر باعث افزایش راندمان غذایی و نهایتاً افزایش وزن فردی در نمونه‌ها می‌گردد.

در تیمار شاهد ضخامت دیواره سلولی روده نازک بوده و هسته‌ها دارای اندازه طبیعی بودند. سلول‌ها به صورت مرتب و در کنار همدیگر به صورت خطی قرار گرفته‌اند. هم‌چنین ضخامت بافت پوششی به صورت معمولی بوده و تغییر چندانی مشاهده نشد. وضعیت مشابهی نیز در تیمار ویتامین C مشاهده شد. ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌های بررسی شده در یک میدان مشخص (۱۰۰ میکرومتر) در زیر میکروسکوپ از سایر تیمارها کم‌تر بود.

در تیمار پدیوکوکوس، چین‌خوردگی بافت پوششی بیش‌تر بوده، سلول‌ها کشیده‌تر و تعداد هسته‌ها در یک میدان مشخص، بسیار بیش‌تر بود ($P<۰/۰۵$). در تیمار لاکتوکوکوس نیز چین‌خوردگی بیش‌تر در بافت پوششی، کشیدگی سلول‌ها، هسته‌ها نسبتاً بزرگتر و تراکم بیش‌تر هسته‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). ضخامت بافت اپیتلیوم در تیمار پدیوکوکوس از سایر تیمارها بیش‌تر بود، در صورتی که بیش‌ترین تعداد سلول‌ها در تیمار لاکتوکوکوس اندازه‌گیری شد ($P<۰/۰۵$).

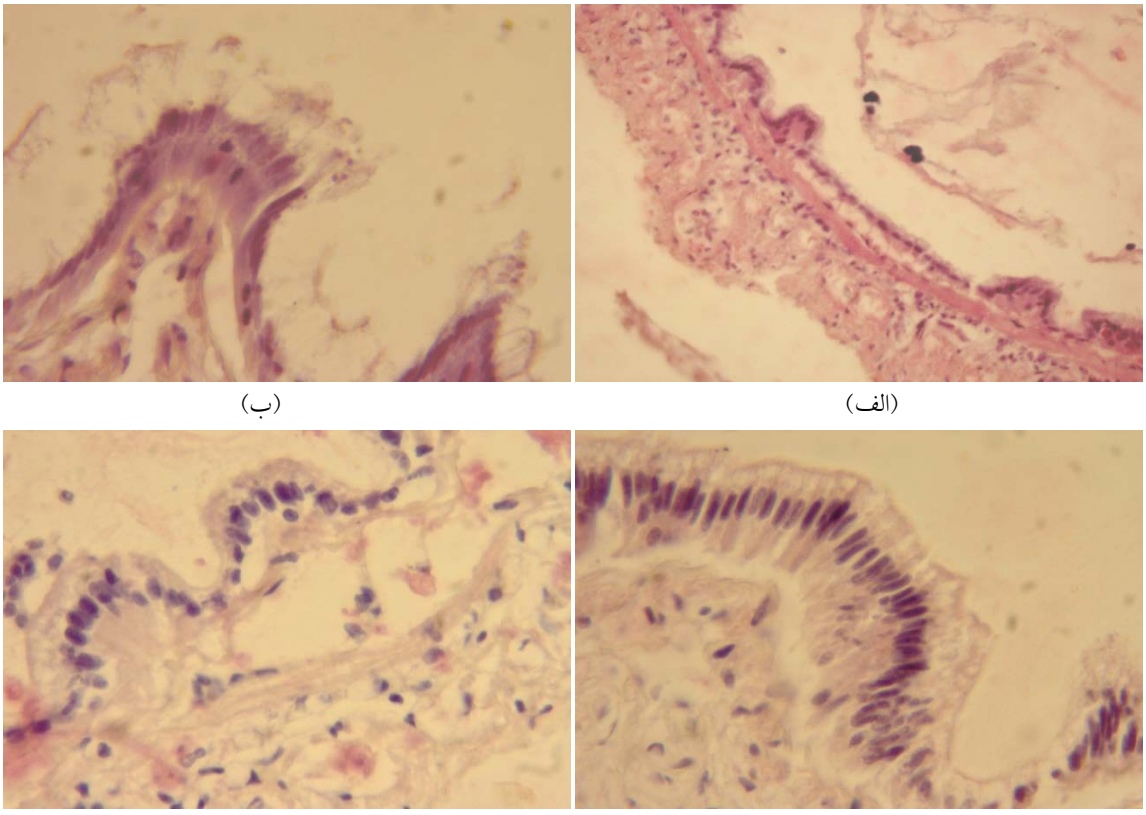
ضخامت اپیتلیوم در تیمار پدیوکوکوس و پس از آن تیمار لاکتوکوکوس دارای بیش‌ترین اختلاف با تیمارهای شاهد و ویتامین C بودند، در حالی که تعداد سلول‌ها در تیمار لاکتوکوکوس به ترتیب بیش‌تر از تیمار پدیوکوکوس، ویتامین C و شاهد محاسبه شد، هر چند تیمار ویتامین C اختلاف معنی‌داری از لحاظ ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌ها با تیمار شاهد نداشت ($p>۰/۰۵$). در جدول ۴-۷ ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌ها در تیمارهای مختلف ارائه شده است.

جدول ۴-۷: مقایسه ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌های بافت روده (Means ±SD) در تیمارهای مختلف

تیمار	شاهد (T.1)	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (T.2)	لاکتوکوکوس لاکتیس (T.3)	ویتامین C (T.4)
ضخامت اپیتلیوم (میکرومتر)	۲۰/۴۲ ±۲/۷۲^{a}	۲۶/۲ ±۵/۰۱^{c}	۲۴/۹۶ ±۲/۸^{b}	۲۰/۴۵ ±۴/۲۵^{a}
تعداد سلول‌ها (در ۱۰۰ میکرومتر)	۲۰/۴۲ ±۳/۸۷^{a}	۲۶/۱۶ ±۵/۹۸^{b}	۲۷/۴۸ ±۴/۳۶^{c}	۲۰/۴۲ ±۴/۸۷^{a}

*حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در شکل ۴-۲ تصاویر مربوط به بافت‌شناسی بافت روده در تیمارهای چهارگانه آورده شده است.



(ب) (الف)

(د) (ج)

شکل ۴-۲: ساختار میکروسکوپی روده میگو در الف) تیمار شاهد (H&E. x40)، ب) تیمار پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (H&E. x100) ج) تیمار لاکتوکوکوس لاکتیس (H&E. x100) د) تیمار ویتامین C (H&E. x100)

۴-۸- آنالیز لاشه

نتایج حاصل از تجزیه بافت عضله میگوهای وانامی مورد بررسی در این آزمایش نشان داد که میزان پروتئین خام در تیمارهای پروبیوتیکی و ویتامین C دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نبودند (p>۰/۰۵). هر چند بیش‌ترین مقدار پروتئین خام در تیمار پدیوکوکوس (۱۹/۵۲±۰/۵۸) به دست آمد.

بیش‌ترین میزان چربی خام در تیمار شاهد و تیمار ویتامین C و کم‌ترین آن در تیمارهای پروبیوتیکی محاسبه شد که دارای اختلاف معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵)، به گونه‌ای که تیمار لاکتوکوکوس دارای کم‌ترین مقدار چربی خام در بافت خود بودند.

کم‌ترین مقدار خاکستر، در تیمار شاهد و تیمار ویتامین C محاسبه شد. در نتیجه آنالیز بافت عضله، تیمارهای پروبیوتیکی دارای بیش‌ترین میزان خاکستر بودند (P<۰/۰۵)، هر چند بین تیمار پدیوکوکوس و تیمار لاکتوکوکوس از این لحاظ اختلاف معنی‌دار نبودند (p>۰/۰۵).

نتایج نشان داد که میزان رطوبت بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار نبودند، هر چند بیش‌ترین مقدار در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد (p>۰/۰۵).

در مجموع استفاده از پروبیوتیک‌ها و ویتامین C در بررسی انجام شده دارای تأثیرات مثبتی بر ترکیب شیمیایی بافت عضله میگوی وانامی نداشتند. در جدول زیر نتایج آنالیز لاشه در تیمارهای مختلف ارائه شده است. در جدول ۴-۸ نتایج آنالیز لاشه میگوهای وانامی در تیمارهای چهارگانه ارائه شده است.

جدول ۴-۸: مقایسه نتایج آنالیز لاشه (Means ±SD) در تیمارهای چهارگانه

تیمار	شاهد (T.1)	پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (T.2)	لاکتوکوکوس لاکتیس (T.3)	ویتامین C (T.4)
پروتئین خام	۱۸/۵۳ ±۰/۸۳^{a}	۱۹/۵۲ ±۰/۵۸^{a}	۱۸/۷۲ ±۰/۴۸^{a}	۱۸/۵ ±۱/۰۱^{a}
چربی خام	۲/۰۸ ±۰/۱۲^{a}	۱/۸۳ ±۰/۱۱^{b}	۱/۸ ±۰/۵۱^{b}	۲/۰۳ ±۰/۱۴^{a}
خاکستر	۱/۳ ±۰/۱۴^{a}	۱/۵۱ ±۰/۲۱^{b}	۱/۴۷ ±۰/۲۱^{b}	۱/۳۴ ±۰/۲۲^{a}
رطوبت	۷۷/۰۱ ±۱/۵^{a}	۷۵/۶۵ ±۰/۸۱^{a}	۷۶/۲۸ ±۰/۸۱^{a}	۷۶/۹۱ ±۱/۴۸^{a}

*حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

فصل پنجم

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱- پارامترهای کیفی آب

تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی، با دیدگاه‌های متفاوتی نظیر بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط پرورشی آن‌ها، پیش‌گیری از ابتلا و مبارزه با عوامل بیماری‌زا و هم‌چنین ارتقای عمل‌کرد رشد آبزیان پرورشی در تحقیقات توسط محققان شیلاتی تأیید شده است (Irianto and Austin 2002, 25). بیش‌تر این تحقیق‌ها منجر به ثبت نتایج با ارزشی شد که امروزه در سیستم‌های پرورشی به‌عنوان فنون کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در مطالعات مختلف، اثرات افزودن پروبیوتیک‌ها بر کیفیت آب پرورش آبزیان مورد بررسی قرار گرفته است. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کارایی بیش‌تری در معدنی کردن مواد آلی دارند (Stanier et al 1963). به نظر می‌رسد که استفاده از سطوح بالاتر باکتری‌های گرم‌مثبت در پرورش آبزیان می‌توانند کربن آلی را در طی چرخه پرورش به دی‌اکسیدکربن تبدیل کرده و تولید فیتوپلانکتون‌ها را افزایش دهد (Scura 1995).

Wang و دیگران (۲۰۰۵) اثر پروبیوتیک‌های تجاری را بر کیفیت آب پرورش میگوی وانامی بررسی نمودند. نتایج نشان داد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌طور معنی‌داری باعث کاهش غلظت ازت و فسفات در آب استخر در مقایسه با گروه شاهد شوند. Rahiman و دیگران (۲۰۱۰) پس از مصرف سویه‌هایی از باکتری-های باسیلوس و ویبریو در غذای میگوی روزنبرگی مشاهده نمودند که کیفیت آب با کاهش غلظت آمونیاک و نیترات بهبود یافت. در حالی که در مطالعه Zhou و دیگران (۲۰۰۹) استفاده از باکتری *B. coagulans* SC8168 به صورت افزودنی به آب در پرورش لارو میگوی وانامی دارای تأثیر مثبتی بر کیفیت آب نبود.

به هر حال در چندین مطالعه انجام شده روی چند سویه باکتریایی در پرورش میگوها (Lin 1995, 13; Rengipipat et al 1998, 167) و گربه‌ماهی (Boyd et al 1984, 46; Chiauvareesajja and Boyd 1993, 116; Queiroz and Boyd 1998, 29; Salminen et al 1996, 70) این فرضیه تأیید نشد. این نتایج نشان می‌دهند که شواهد کافی برای اثبات بهبود کیفی آب توسط پروبیوتیک‌ها وجود ندارد.

در بررسی حاضر مصرف پروبیوتیک‌ها و ویتامین C دارای تأثیر قابل توجهی بر فاکتورهای کیفی آب نبوده است، به‌طوری که بین تیمارهای مختلف در طی دوره‌ی پرورش، پارامترهای اکسیژن محلول، شوری، pH و آمونیاک کل دارای تفاوت معنی‌دار نبودند. در واقع محدوده‌ی pH، اکسیژن محلول و غلظت آمونیاک کل در

حد قابل قبول شرایط پرورش نگه داشته شدند (Boyd and Tucker 1998). این نتایج می‌تواند به علت کیفیت مناسب آب و شرایط مطلوب پرورش در طول دوره باشد. در کل دوره به دلیل هوادهی مستمر، اکسیژن محلول نزدیک به حد اشباع نگه داشته شد که خود عامل اصلی حفظ شرایط مطلوب به‌وسیله‌ی تأمین اکسیژن محلول مورد نیاز موجودات درون استخر جهت سوخت‌وساز، حذف گازهای نامطلوب و سمی مانند دی‌اکسیدکربن و سولفید هیدروژن و تغییرات شدید ناشی از تأثیر عوامل نامساعد می‌گردد. هم‌چنین با اعمال مدیریت صحیح از طریق پایش مداوم، تعویض و خروج آب از لایه‌های زیرین در مواقع ضروری، منجر به حذف عوامل ناخواسته و نامساعد گردید.

۵-۲- فاکتورهای رشد

هدف همیشگی تولید آبزیان به حداکثر رساندن کارایی و بازده تولید برای حداکثر سوددهی است. جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها نه تنها مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کند، بلکه می‌تواند یکی از بهترین راه‌کارها برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آن‌ها به استرس و عوامل بیماری‌زا باشد (Gatlin 2002). در باکتری‌ها، مکانیسم‌های متعددی که به موجب آن به عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفته است. این راه‌کارها شامل چسبیدن به دیواره‌ی دستگاه گوارش برای جلوگیری از کلونیزه عوامل بیماری‌زا (پیوست رقابتی)، خنثی‌سازی سموم، فعالیت باکتریوسین‌ها و افزایش توانایی سیستم ایمنی بدن می‌باشد (Fernandez et al 2011, 6). پروبیوتیک‌ها همواره به دلیل داشتن مزایای فراوان به عنوان یکی از راه‌های افزایش بازده آبزی‌پروری مطرح بوده‌اند. از میان فواید متعدد پروبیوتیک‌ها، محققین تأثیر آن‌ها را در بهبود رشد آبزیانی که در جیره غذایی آن‌ها پروبیوتیک استفاده شده بود، گزارش کرده‌اند (Ghosh et al 2007, 38; Lara et al 2003, 216). مانند سایر موجودات آبزی، میگوی سفید غربی دارای ارتباط تنگاتنگ با میکروارگانیسم‌های محیط 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 (Ziaei-Nejad et al 2006, 252, Castex et al 2009, 294, Yang et al 2010, 309).

طبق نظر محققان از اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها در موجودات زنده می‌توان به بهبود تغذیه میزبان، افزایش بقا، بازده غذایی، جلوگیری از اختلالات روده‌ای و پیش هضم عوامل تغذیه‌ای موجود در مواد تشکیل دهنده غذا اشاره کرد. هم‌چنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق سم‌زدایی ترکیبات مضر موجود در جیره به‌وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی و تولید ویتامین‌هایی مانند بیوتین و ویتامین B_{12} تغذیه را بهبود بخشند. پروبیوتیک‌ها پس از انتقال به روده با استفاده از قندها (کربوهیدرات‌ها) شروع به رشد می‌کنند.

باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک شامل جنس‌های متنوعی همچون *Lactobacillus*، *Aerococcus*، *Pediococcus*، *Enterococcccus*، *Alloicoccus*، *Lactococcus* و غیره می‌باشند (Stiles and Holpzapfel 1997, 36; Axelsson 1998, 1) که جزء موثرترین پروبیوتیک‌ها می‌باشند.

داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از ترکیب پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس، لاکتوکوکوس و ویتامین C در جیره غذایی، سبب ارتقای شاخص‌های رشد میگوهای وانامی گردید. افزایش شاخص‌های رشد به دنبال مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها در تحقیقات مختلف، هم‌سو با نتایج حاصل از این تحقیق، گزارش شده است. برای مثال Uma و دیگران (۱۹۹۹)، Sridhar و Paulraj (۲۰۰۳) و Fernandez و دیگران (۲۰۱۱) در میگوی هندی، Venkat و دیگران (۲۰۰۴) و Rahiman و دیگران (۲۰۱۰) در میگوی روزنبرگی، Garrique و Arevalo (۱۹۹۵)، Gullian و دیگران (۲۰۰٤)، Wang (۲۰۰۷)، Balca´zar و دیگران (۲۰۰۷)، Zokaiefar و دیگران (۲۰۱۲) و Kumar و دیگران (۲۰۱۳) و Sapcaroen و Rengpipat (۲۰۱۳) در میگوی وانامی، Zhang و دیگران (۲۰۰۹) در میگوهای چینی افزایش شاخص‌های رشد، بقا و کاهش مرگ و میر را در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها گزارش نمودند.

۵-۳- نرخ بقا

از جمله فواید پروبیوتیک‌ها می‌توان به اثر مثبت آن‌ها در ارتقای سلامت و بهبود بقای میزبان اشاره نمود (Wang et al 2008, 277). استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بقای میگوها از طریق حذف رقابتی عوامل بیماری‌زا در شرایط پرورش می‌شوند (Griffith 1995, 478). 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 به‌وسیله‌ی تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی و فعالیت ضدویروسی قادر به افزایش بقای آبزیان باشند (Saurabh and Sahoo 2008, 39). در بررسی انجام شده نرخ بازماندگی در انتهای دوره در تیمارهای پروبیوتیکی (بیش‌ترین بازماندگی در تیمار پدیوکوکوس) دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بودند.

در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد که در تمام شاخص‌های رشد مورد بررسی، تیمار پدیوکوکوس بالاترین تأثیر را داشته است. برخلاف گزارش‌های مذکور، برخی محققان عدم تأثیر مناسب پروبیوتیک‌ها را بر پارامترهای رشد و نرخ بازماندگی میگوها گزارش کرده‌اند. برای مثال Shariff و دیگران (۲۰۰۱) استفاده از

مکمل‌های باکتریایی تجاری را بر افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی به ترتیب میگوهای مونودون بی‌اثر دانستند.

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از ویتامین C نیز در جیره غذایی، سبب افزایش نرخ رشد و بازماندگی در میگوهای وانامی گردید. هم‌راستا با نتایج این تحقیق، Lee و Shiau (۲۰۰۲)، در میگوی مونودون، Shiau و Hsu (۱۹۹۴)، Gomez-jimenez و دیگران (۲۰۰۵) و Darvishpour و دیگران (۲۰۱۲) بر میگوی وانامی و Manush و دیگران (۲۰۱۳) سطوح مختلف ویتامین C را بر میگوی روزنبرگی نشان دادند دارای افزایش قابل توجهی در شاخص‌های رشد بودند در صورتی که He و Lawrence (۱۹۹۳) سطوح مختلف ویتامین C را بر شاخص‌های رشد و نرخ بازماندگی میگوی وانامی بررسی و بیان نمودند استفاده از این مکمل باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در گروه‌های مختلف نگردید.

در این بررسی بیش‌ترین نرخ بقا در انتهای دوره در تیمار پدیوکوکوس مشاهده گردید. پس از آن به ترتیب تیمارهای لاکتوکوکوس و ویتامین C قرار داشتند که دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بودند.

در مجموع به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌های این تحقیق، با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه دستگاه گوارش، باعث افزایش قابلیت هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش کارایی تغذیه‌ای شده‌اند و بهره‌برداری از غذا را حتی در شرایط تراکم بالا نیز افزایش داده و با تعادل رساندن میکروفلور دستگاه گوارش، باعث افزایش شاخص‌های رشد گردیدند.

۵-۴- آنزیم‌های گوارشی

با توجه به اثرات پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، بهبود تغذیه‌ای گونه‌های میزبان از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی مکمل یکی از روش‌های اثرگذاری این محرک‌ها می‌باشد (Verschuere et al 2000, 64). تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشد (Sunde et al 2001, 25). از فعالیت آنزیم‌های هضمی به عنوان شاخصی جهت تفاوت‌های رشدی و مصرف غذا یاد می‌شود. افزایش سطوح فعالیت آنزیمی حاصل از رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک، هضم پروتئین، نشاسته، چربی و سلولز را بهبود بخشیده که می‌تواند رشد بهتر مشاهده شده در جیره‌های غذایی محتوی مکمل پروبیوتیک را توجیه کند. حضور و میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان یک شاخص برای ارزیابی مراحل تکامل جنینی، پذیرش غذا، ظرفیت گوارش و میزان بقای جانوران آبزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ueberschar 1995, 201).

بسیاری از پروبیوتیک‌های باکتریایی، انواع وسیعی از آنزیم‌های گوارشی برون‌زا را تولید نموده که مسئول جذب مواد مغذی هستند (Zhou et al 2009, 287). با وجود این‌که آنزیم‌های گوارشی برون‌زای تولید شده

توسط پروبیوتیک‌ها در مقایسه با کل آنزیم موجود در دستگاه گوارش اندک است، ممکن است منجر به تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش شوند (Ziaei-Nejad et al 2006, 252; Wang 2007, 269). در هر صورت نمی‌توان فعالیت آنزیم‌های سنتز شده توسط میگو یا سویه‌های پروبیوتیک کلونیزه شده در دستگاه گوارش میگو را از یک‌دیگر تشخیص داد.

نتایج حاصل از تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس (به میزان بیش‌تر) و لاکتوکوکوس بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت این آنزیم‌ها در تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره‌ی پرورش نسبت به تیمار شاهد بود. استفاده از ویتامین C نیز در جیره غذایی باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آلکالین فسفاتاز نسبت به تیمار شاهد گردید. هرچند که تأثیر ویتامین C در افزایش آنزیم‌ها نسبت به پروبیوتیک‌ها به مراتب کم‌تر بود.

Ochoa Solano و Olmos Soto (۲۰۰۶) بیان نمودند که تسهیل عمل هضم در میگو می‌تواند به علت سنتز آنزیم‌های تولید شده به وسیله باکتری‌های پروبیوتیکی بوده که قادرند فعالیت‌های آنزیمی میگو و در نتیجه قابلیت هضم مواد غذایی را افزایش دهند. شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوهای وانامی تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک افزایش قابل توجهی نسبت به میگوهای تغذیه شده با جیره پایه نشان دادند (Wang 2007, 269). علاوه بر این آنزیم‌های گوارشی تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها، در محدوده‌ی pH گسترده‌تری نسبت به آنزیم‌های میگو فعالند، در نتیجه امکان هضم غذا را در محدوده وسیع‌تری مهیا می‌کند.

افزایش قابل توجه فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها در ماهیان و میگوها که در نهایت منجر به افزایش هضم غذا می‌گردد، در تحقیقات محققان هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر گزارش شده است (Lara et al 2003, 216; Tovar-Ramírez et al 2004, 234; Wang and Xu 2006, 127). موارد مشابهی از توانایی تولید آنزیم‌های گوارشی خارج سلولی توسط باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش میگوی چینی (Wang et al 2006, 12)، شانک (Suzer et al 2008, 280)، هامور (Son et al 2011, 26)، میگوی سفیدهندی (Ziaei-Nejad et al 2006, 252) و میگوی پاسفید غربی (Wang 2007, 269) نیز گزارش شده است که همگی تأیید کننده نتایج آزمایش حاضر در افزایش آنزیم‌های گوارشی آلفا-آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز در وانامی می‌باشد.

در بررسی‌های مختلف افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آلفا آمیلاز میگوی وانامی در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها اعلام شده است (Zhou et al 2009, 287; Wang et al 2012, 3; Yuniarti et al 2013, 3). Zokaiefar و دیگران (۲۰۱۲) افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز و Wang (۲۰۰۷) افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز را در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها در میگوی وانامی اعلام نمودند، در حالی که بر

خلاف نتایج تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم آمیلاز افزایشی نشان نداد. در تحقیق Ziaei-Nejad و دیگران (۲۰۰۶) استفاده از پروبیوتیک‌های تجاری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز گردید، درحالی که تأثیری بر پروتئاز نداشت که با یافته‌های این تحقیق هم‌سو نبود.

در بررسی Castex و دیگران (۲۰۰۸) پس از مصرف باکتری *P. acidilactici* در میگوی آبی (*Litopenaeus stylirostris*) فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز (موافق با نتایج حاضر) و تریپسین (برخلاف نتایج تحقیق حاضر) دارای افزایش معنی‌داری در پایان دوره بودند. Manush و دیگران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که ویتامین C باعث افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در میگوی وانامی گردید.

به‌طور کلی، تریپسین و کیموتریپسین شایع‌ترین آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده که مسئول هضم پروتئین غذا در دستگاه گوارش میگوهای پنائیده می‌باشند (Sainz Hernandez and Cordova Murueta 2009, 290). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد.

برخی محققان نشان داده‌اند که فعالیت تریپسین می‌تواند در واکنش به مقدار کم پروتئین موجود در غذا و یا دسترسی نامناسب به پروتئین غذا به دلیل قابلیت هضم ضعیف، افزایش یابد (Le Vay et al 1993, 118; Rodriguez et al 1994, 118; Kumlu and Jones 1995, 26; Lemos and RodrõÂguez 1998, 160). هنگامی که میگوها با غذای نامناسب تغذیه می‌شوند، در پاسخ به قابلیت هضم کم مواد غذایی که به محتویات پروتئینی نامطلوب غذا برمی‌گردد، فعالیت تریپسین ممکن است افزایش یابد. به‌طوری که LeVay و دیگران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که در پست‌لاروهای میگوی ژاپنی (*P. japonicas*) تغذیه شده با پلت‌های کارخانه‌ای بدون افزودن مواد محرک رشد و ویتامین‌ها، رشد کم‌تر و افزایش فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به گروه شاهد مشاهده شد.

در بررسی حاضر میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای پروبیوتیکی و ویتامین C اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان نداد. احتمالاً کیفیت مطلوب غذا و تأمین احتیاجات پروتئینی به حد مکفی، عامل موثر در عدم تأثیر مواد نامبرده بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین می‌باشد. در واقع به علت دسترسی و حد مناسب پروتئین در جیره غذایی، نیازی به تحریک و افزایش فعالیت این آنزیم‌های پروتئولیتیک نبوده است. در حالی که Nimrat و دیگران (۲۰۱۳) اعلام کردند که مصرف ترکیبی از پروبیوتیک‌ها در میگوی مونودون منجر به افزایش آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین گردید.

تصور می‌شود که پروبیوتیک‌ها، فرآیندهای گوارشی را از طریق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، بهبود تعادل میکروبی روده و در نتیجه بهبود هضم، جذب و مصرف غذا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Suzer et al 2008, 280). بنابراین، باکتری‌های ذکر شده با شرکت در فرآیند هضم،

کارایی دستگاه گوارش را افزایش و در نهایت موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌شوند. تحقیقات نشان داده که باکتری‌های مذکور موجب افزایش هضم پروتئین، چربی و نشاسته موجود در غذا می‌شوند (Wang and Xu 2006, 127)، لذا احتمالاً باکتری‌های پروبیوتیکی آزمایشی (به خصوص پدیوکوکوس) توانسته‌اند به این وسیله سبب افزایش بازده استفاده از پروتئین‌های موجود در جیره غذایی میگوهای وانامی شوند و فعالیت برخی آنزیم‌ها را افزایش دهند.

ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب جهت مقایسه ضریب رشد آبزی، پذیرش غذا و هم‌چنین ظرفیت گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد باکتری‌های پدیوکوکوس (به میزان بیش‌تر) و لاکتوکوکوس (به میزان کم‌تر) و در مواردی ویتامین C با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه دستگاه گوارش میگوهای وانامی باعث افزایش قابلیت هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش ضریب رشد ویژه گشته‌اند. همان‌گونه که از نتایج این آزمایش مشخص است، تیمار پدیوکوکوس توانسته‌اند فلور غالبی را در روده میگوی وانامی ایجاد کند و به تبع آن باکتری‌های اسید لاکتیک نیز افزایش یافته‌اند و شاخص‌های رشدی را نسبت به لاکتوکوکوس و ویتامین C بیش‌تر تحت تأثیر قرار داده است.

۵-۵- ایمنی

عوامل نامساعد محیطی و استرس‌های ناشی از تراکم در استخرهای پرورشی، عامل ایجاد استرس و شیوع بیماری است. بنابراین، تغییرات ناگهانی در شرایط محیطی می‌تواند منجر به شیوع بیماری‌های جدی و نهایتاً مرگ در سیستم‌های آبزی‌پروری گردد. استفاده از مکمل‌های غذایی که در بالا بردن سیستم ایمنی نقش دارند، از جمله راه‌کارهایی می‌باشند که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم در جهت حمایت از رشد و تکامل موجودات آبزی، می‌توانند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا مفید واقع شوند (Gatlin 2002, 671). به خصوص، تجویز خوراکی برخی از سویه‌های باکتری‌های لاکتیک اسید موجب افزایش پاسخ ایمنی مانند فعالیت فاگوسیتوز، لیزوزیم، فعالیت فنول‌اکسیداز و سنتز سایتوکین‌ها می‌شود (Panigrahi et al 2007, 31).

ارتقای نرخ بقا در میگوهای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی ممکن است به واکنش ایمنی پروبیوتیک‌ها بر میزبان مرتبط باشد. جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در دستگاه گوارش، تحت تأثیر عوامل تغذیه‌ای و محیطی مانند اسیدهای چرب اشباع نشده غذا، استرس و شوری می‌باشد (Fernandez et al 2011, 6). باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیبات خارج سلولی تولید نموده که می‌توانند پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی را در مهره‌داران تحریک کنند (Marteau et al 2002, 88; Gill 2003, 17).

اسیدلاکتیک تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، pH محتویات دستگاه گوارش را کاهش می‌دهد. مطالعات نشان دادند که در شرایط اسیدی و pH کم‌تر از ۴/۵ رشد بسیاری از باکتری‌ها مانند کلی‌فرم‌ها متوقف می‌شود، در صورتی که برخی گونه‌ها توانایی حفظ حیات و توسعه را دارند (Sissons 1989, 49). هم‌چنین باکتری‌های اسیدلاکتیک، پراکسیدهیدروژن تولید می‌کنند که در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات ضدباکتریایی بوده و از طریق خنثی کردن سم آزاد شده از کلی‌فرم‌ها، دارای اثرات مثبت هستند.

اگرچه باکتری‌های اسیدلاکتیک فلور غالب دستگاه گوارش در ماهی‌های دریایی و سخت‌پوستان نیستند، محققان این باکتری‌ها را برای حافظت از آبزیان در برابر عفونت‌های ناشی از ویبریو به استخرهای پرورش ماهیان دریایی و میگوها معرفی نمودند.

فعال‌سازی و افزایش پاسخ ایمنی سلولی و هومورال نظیر فاگوسیتوز، فنول‌اکسیداز و فعالیت‌های ضدمیکروبی همولنف همراه با افزایش نرخ رشد و بقا و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا مانند باکتری ویبریو در اثر تغذیه با پروبیوتیک‌های گوناگون در میگوهای مونودون (Rengpipat et al 2000, 191; Decamp et al 2008, 39; Vaseeharan and Ramasamy 2003, 36) و میگوی وانامی (Liu et al 2009, 28; Chiu et al 2007, 23; Li 2008, 39) گزارش شده است. علاوه بر این افزودن ویتامین C به غذای میگوی رودخانه‌ای (*Macrobrahcium nipponese*) باعث افزایش توانایی این میگوها جهت مقاومت نسبت به افزایش سطوح آمونیاک آب گردید (Wang et al 2005, 71) که با یافته‌های Wang و دیگران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. با این حال، مسائل مربوط به زنده ماندن باکتری‌ها و توانایی چسبیدن به روده باید بررسی شود. باکتری‌هایی که به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند، علاوه بر زنده ماندن باید توانایی چسبیدن و کلونیزه شدن در اپیتلیوم روده میگو را داشته باشند (Ollson et al 1992, 58).

نتایج حاصل از این تحقیق در ادامه‌ی تحقیقات انجام شده بر روی کارایی پروبیوتیک‌ها در افزایش کارایی صنعت آبزی‌پروری نشان داد که عوامل بیولوژیک مانند باکتری‌ها و هم‌چنین ویتامین C می‌توانند قابلیت‌های بالا و ارزشمندی در افزایش مقاومت میگوی وانامی در برابر شرایط محیطی داشته و به عنوان فناوری نوین زیستی مورد بررسی قرار گیرد. هرچند عمل‌کرد دقیق پروبیوتیک‌ها باید بررسی گردد، گرچه عوامل متعددی نظیر منشأ، نوع، دوز مصرفی و مدت زمان استعمال پروبیوتیک می‌تواند بر فعالیت تنظیم ایمنی پروبیوتیک اثر بگذارد.

۵-۵-۱ فعالیت فنول اکسیداز

سیستم ایمنی در سخت‌پوستان نسبت به مهره‌داران بسیار ابتدایی بوده و توسعه کمی یافته است (Rodriguez and Le Moullac 2000, 191). میگوها جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا به ایمنی غیراختصاصی وابسته هستند. فعالیت فنول‌اکسیداز یکی از مهم‌ترین پارامترهای ایمنی غیراختصاصی در

سخت‌پوستان بوده و می‌تواند به عنوان شاخص سلامت مطرح باشد، زیرا تغییرات این فاکتور به‌طور مستقیم به وضعیت بیماری و تغییرات محیطی وابسته است (Rodrı´guez and Le Moullac 2000, 191; Song et al 2003, 14). تحقیقات نشان دادند که اندکی کاهش فعالیت این آنزیم از حد نرمال منجر به کاهش مقاومت میگو نسبت به عوامل بیماری‌زا می‌گردد (Li et al 2005, 19; Wang and Chen 2006, 258).

اجزای دیواره سلولی عوامل بیماری‌زا در باکتری‌ها (β- گلوکان و لیپوپلی‌ساکارید) و قارچ‌ها (۳،۱- گلوکان) توسط سیستم پروفنول اکسیداز تشخیص داده شده و با تحریک سیستم ایمنی به مزاحمان واکنش نشان می‌دهد (Gullian et al 2004, 233; Rengpipat et al 2000, 191). به بیان دیگر سطح دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها و یا متابولیت‌های آن‌ها به عنوان محرک‌های سیستم ایمنی عمل نموده و از طریق تحریک فعالیت سیستم پروفنول اکسیداز منجر به پاسخ‌های ایمنی مناسب در میگو می‌گردد (Swain et al 2009, 25).

فنول‌اکسیداز آنزیمی است که اکسیداسیون ترکیبات فنولی مانند تیروزین و DOPA را سرعت بخشیده و منشاء یک توالی مولکولی پیچیده‌ای شده که با تشکیل رنگدانه‌ای تیره به نام ملانین به اوج خود می‌رسد. در طول این توالی، چندین ترکیبات حد واسط سمی مانند کوئینون[1] را به وجود آورده که اثرات ضد میکروبی دارند (Sritunyalucksana and Söderhäll 2000, 191).

برخی بررسی‌ها افزایش فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در میگوی وانامی (Gullian et al 2004, 233; Li et al 2009, 291; Xia et al 2013, 58; Tseng et al 2009, 26; Chiu et al 2007, 23; Liu et al 2009, 207)، میگوی مونودون (Rengpipat et al 2000, 191)، میگوی روزنبرگی (Rahiman et al 2010, 41) و میگوی چینی (Zhang et al 2009, 40) را در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها گزارش کردند که در نهایت منجر به افزایش مقاومت میگوها در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی گردید. گزارشات مذکور موافق با یافته‌های این تحقیق می‌باشد، به گونه‌ای که میزان فعالیت آنزیم در تیمار پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود، به گونه‌ای که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در تیمار پدیوکوکوس مشاهده شد. در این بررسی، استفاده از ویتامین C دارای اثر قابل توجهی بر میزان فعالیت فنول‌اکسیداز میگوهای وانامی نبود، هر چند اندکی افزایش نسبت به تیمار کنترل وجود داشت. بر خلاف نتایج تحقیق حاضر Vieira و دیگران (۲۰۱۰) اعلام کردند که فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز در میگوهای وانامی تغذیه شده با پروبیوتیک *L. plantarum* دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل نبودند، هرچند اندکی افزایش در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده شد. این عدم کارایی پروبیوتیک ممکن است به شرایط آزمایش و یا ضعف جسمانی لاروها و عدم هضم مطلوب غذا و محتویاتش مربوط باشد.

[1] quinones

۵-۵-۲ فعالیت لیزوزیم

لیزوزیم با اثر بر پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را پاره نموده و بدین ترتیب به‌طور غیراختصاصی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. باکتری‌های گرم‌منفی نیز اگرچه به طور مستقیم تحت تأثیر لیزوزیم قرار نمی‌گیرند، اما با اثر بر لایه پپتیدوگلیکان انهدام باکتری‌های گرم منفی را تسریع می‌بخشند. این آنزیم موجب تسهیل عمل بیگانه‌خواری سلول‌های فاگوسیت کننده نیز می‌گردد (سلطانی ۱۳۸۷،۲٤۰).

لیزوزیم در opsonization نیز مشارکت دارد که این فرآیند پاسخ ایمنی می‌باشد که سبب تسهیل عمل فاگوسیتوز می‌گردد (محمدیان ۱۳۹۲، ۱۳۱). هم‌چنین به‌نظر می‌رسد این آنزیم فعالیت ضد ویروسی داشته و در نتیجه به‌عنوان یک بخش مهم از مکانیسم دفاع غیراختصاصی به شمار می‌رود (Choi et al 2008, 24). فعالیت لیزوزیم متأثر از جنسیت، سن، اندازه، فصل، دمای آب، pH، مواد سمی، بیماری‌ها و استرس‌های محیطی تغییر می‌کند (Saurabh and Sahoo 2008, 39).

یافته‌های تحقیق حاضر در مورد میزان لیزوزیم سرم با یافته‌های Wang و دیگران (۲۰۰۸) و پورفرهادی (۱۳۹۰) هم‌سو می‌باشد که افزایش میزان لیزوزیم را با افزودن پروبیوتیک در ماهی‌های تیلاپیا (*O.niloticus*) و کپور معمولی گزارش گردید، اما این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بر خلاف تحقیق حاضر، Liu و دیگران (۲۰۰۹) اعلام کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها به صورت افزودنی به آب پرورش میگوی وانامی موجب افزایش فعالیت لیزوزیم گردید که با یافته‌های Son و دیگران (۲۰۱۱) هم‌خوانی دارد.

به نظر می‌رسد مصرف پروبیوتیک‌ها و ویتامین C در میگوی وانامی نتوانسته تأثیر مناسبی در ارتقای این فاکتور سیستم ایمنی داشته باشد و موجب تحریک میزبان به افزایش فعالیت لیزوزیم به اندازه کافی نشده‌اند. این ناکارآمدی ممکن است به پست بودن سیستم ایمنی میگو مرتبط باشد. فرضیه دیگر این است که مقدار مواد به کار رفته برای تحریک سیستم ایمنی میگو جهت افزایش فعالیت لیزوزیم مناسب نبوده باشد.

۵-۵-۳ بررسی میزان پروتئین تام

فاکتور ایمنی دیگر مورد بررسی، مقدار پروتئین و گلوبولین همولنف بوده است. اکثر پروتئین‌های پلاسما توسط کبد سنتز می‌شوند و در بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات فیزیولوژیکی بخشی از پروتئین‌های پلاسما از بدن دفع می‌شوند. پروتئین‌های پلاسما براساس عمل‌کردشان به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. 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 ماهیان می‌تواند به عنوان یک شاخص برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گیرد (محمدیان ۱۳۹۲، ۱۳٤).

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 گردید، در حالی که مصرف ویتامین C در مطالعه حاضر تأثیر مثبتی بر افزایش این پارامتر نداشت. در راستای این یافته‌ها، Wang و دیگران (۲۰۰۸) با مطالعه اثرات پروبیوتیک *E.faecium* بر پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان متوجه شدند که افزودن پروبیوتیک به جیره‌ی غذایی ماهیان باعث ارتقای پروتئین‌های سرم خون (آلبومین، گلوبولین و پروتئین تام) گردید. پورفرهادی (۱۳۹۰) نیز تأثیر سین‌بیوتیک بایومین ایمبو را بر فعالیت لیزوزیم بچه‌ماهیان کپور را بررسی و اعلام نمودند که ماده نام‌برده سبب افزایش پروتئین‌های تام خون گردید. همان‌طور که از نتایج این تحقیق مشخص است، استفاده از پروبیوتیک‌های پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس تأثیر مناسبی بر سطح پروتئین تام و گلوبولین همولنف داشته که در نهایت منجر به افزایش ایمنی غیراختصاصی در میگوهای وانامی گردید. در حالی که ویتامین C نتوانسته به حد کافی منجر به تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی میگوهای وانامی گردد.

۵-۵-۴ چالش باکتریایی

در آبزیان، فلور غالب دستگاه گوارش ترکیبی از باکتری‌های گرم‌منفی شامل جنس‌هایی از *Vibrio*، *Pseudomonas* و *Aeromonas* هستند (Vine et al 2006, 30). با این وجود، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که فلور باکتریایی را می‌توان با افزودن باکتری‌های گرم‌مثبت در رژیم غذایی (Ziaei-Nejad et al., 2006, 252; Vieira et al 2010, 62) و یا آب (Rengpipat et al 1998, 167; 2000, 191) تغییر داد.

در بررسی Vieira و دیگران (۲۰۱۰) تغذیه میگوهای وانامی با مکمل پروبیوتیکی باعث کاهش باکتری‌های ویبریو و افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک گردید. هم‌راستا با یافته‌های مذکور، در بررسی‌های مختلف مصرف پروبیوتیک باعث کاهش مرگ و میر میگوهای مونودون و وانامی پس از چالش با

باکتری‌های ویبریو گردید (Vaseeharan and Ramasamy 2003, 36; Swain et al 2009, 25; Balcazar et al 2007, 96; Utiswannakul et al 2011; Nimrat et al 2013, 21; Zokaiefar et al 2012, 33). کاهش نرخ مرگ‌ومیر میگوهای تغذیه شده با پروبیوتیک پس از چالش با باکتری‌های ویبریو ممکن است به کلونیزه شدن پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش، بیوسنتزهای مختلف مواد بازدارنده مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها، لیزوزیم، پروتئاز و پراکسیدهیدروژن و تغییر pH از طریق ترشح اسیدهای آلی و برخی از محصولات جانبی ناشناخته مرتبط باشد که دارای اثر منفی بر روی ویبریو هستند (Sahu et al 2008, 48).

در بررسی Castex و دیگران (۲۰۱۰) نرخ مرگ و میر میگوی آبی پس از چالش با *V. nigripulchritudo* از ۴۱/۷ به ۲۵ درصد در تیمارهایی که *P. acidilactici* مصرف کرده بودند، تقلیل یافت. برخی تحقیقات نیز افزایش مقاومت میگوها را در برابر ویبریوی بیماری‌زا در اثر مصرف پروبیوتیک ثابت کرده‌اند (Rengpipat et al 1998, 167; Scholz et al 1999, 176). Chiu و دیگران (۲۰۰۷) بازماندگی میگوی وانامی را پس از مصرف *L. plantarum* به میزان 10^6 CFU g^{-1} مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان دهنده‌ی افزایش قابل توجه نرخ بقا در این میگو پس از چالش بوده که در واقع ناشی از افزایش پاسخ‌های سلولی و هومورال مانند فعالیت فنول‌اکسیداز و قدرت باکتری‌کشی می‌باشد.

در این بررسی پس از تعیین LD_{50} و چالش با باکتری *Vibrio parahaemolyticus* نرخ مرگ‌ومیر روزانه در یک دوره‌ی ۱۰ روزه بررسی شد. در دو روز اول مرگ‌ومیری مشاهده نشد، هر چند برخی از میگوها علائم بیماری را نشان دادند. در پایان دوره، بیش‌ترین نرخ مرگ‌ومیر در تیمار شاهد و بالاترین بازماندگی در تیمار پدیوکوکوس به دست آمد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری‌های پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس باعث ایجاد یک فلور طبیعی پایدار در دستگاه گوارش شده (به خصوص پدیوکوکوس) که تأثیر به سزایی بر زنده‌مانی میگوهای وانامی متعاقب چالش با ویبریو پاراهمولیتیکوس دارد. نظر به این‌که مقاومت باکتریایی میگوهای تیمارهای پروبیوتیکی افزایش داشته‌است، می‌توان عنوان نمود که سطح ایمنی میگوها در اثر مصرف مواد نام‌برده در طول دوره پرورش ارتقا یافته که نتیجه آن افزایش مقاومت در برابر بیماری ویبریوزیس بود، به طوری که ۴۰ درصد از میگوهای تیمار پدیوکوکوس پس از دوره‌ی ده روزه زنده ماندند، ولی به نظر می‌رسد ویتامین C در مقایسه با پروبیوتیک‌ها تأثیر کم‌تری در ارتقای سیستم ایمنی و مواجهه با ویبریو در میگوهای وانامی داشته است، به طوری که تیمار ویتامین C در مقایسه با گروه شاهد ماندگاری بیش‌تری داشتند، در حالی که نسبت به تیمارهای پروبیوتیکی نرخ مرگ و میر به شدت بیش‌تر بوده است.

۵-٦- ترکیب لاشه

ترکیب عضله میگوها تحت تأثیر عواملی نظیر گونه، مراحل رشد، غذا و فصل قرار می‌گیرد (Karakoltsidis et al 1995, 8). میگوها مانند ماهیان از جمله موجوداتی هستند که حاوی مواد مغذی و پروتئینی بسیار مناسب بوده و حاوی ۲۰-۸ درصد پروتئین می‌باشند (Gunalan et al 2013, 5). در سایر گزارشات محتوای پروتئینی میگو بسته به گونه در محدوده‌ی ۲۱-۱۷ درصد بیان شده است (Sriket et al 2007, 103; Yanar and Celik 2006, 94). هم‌چنین Sriraman (۱۹۷۸) محتویات پروتئینی سخت‌پوستان و نرم‌تنان را در حدود ۲۰ درصد اعلام نمود.

پروتئین به عنوان مهم‌ترین جزء بیوشیمیایی در عضله میگو می‌باشد (Abdel-Salam and Hamdi 2011, 61; Rosa and Nunes 2002, 247; Ehigiator and Oterai 2012, 11). پروتئین جهت انجام اعمال عمومی بدن، رشد و نگهداری بافت‌های بدن ضروری می‌باشد. محتوای پروتئینی یک بافت به عنوان ابزاری مهم جهت ارزیابی استانداردهای فیزیولوژیکی مطرح است (Bhavan et al 2010, 2)، برای مثال سطوح بالای پروتئین در قسمت خوراکی، نشان‌دهنده ارزش غذایی بالا در میگوی هندی است (Abdel-Salam 2013, 2). محتویات پروتئینی غنی در سخت‌پوستان می‌تواند به خصوصیات غذایی همه‌چیزخواری این جانداران مرتبط باشد (Bello-Olusoji et al 1995, 24).

محتوای پروتئینی در میگوی موزی (*Penaeus merguensis*) ۲۴/۰۳ درصد گزارش شده است (Mahata 2007). در این تحقیق میزان پروتئین در میگوی وانامی در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشتند و در حدود ۲۰ درصد بوده است. هر چند که اندکی افزایش پروتئین در تیمارهای پروبیوتیکی به چشم می‌خورد که با یافته‌های Silva و Chamul (۲۰۰۰)، Sriraman (۱۹۷۸)، Nair و Prabhu (۱۹۹۰)، Reddy و Shanbhogue (۱۹۹۴) و Ravichandran (۲۰۰۰) مطابقت دارد.

چربی‌ها به عنوان منبع اصلی تأمین انرژی مطرح بوده که محتوی انرژی آن دو برابر کربوهیدرات و پروتئین می‌باشد (Okuzumi and Fujii 2000, 200). به‌طور کلی، چربی در کنار پروتئین به عنوان ذخایر اصلی مواد غذایی شناخته شده و مقدارشان در اثر متغیرهای محیطی مانند دما تغییر می‌کنند (Pillay and Nair 1973, 18). مقدار چربی در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌دار بود، به طوری که کم‌ترین مقدار چربی در تیمار پدیوکوکوس و بیش‌ترین آن در تیمار شاهد و ویتامین C محاسبه گردید.

میزان رطوبت در عضله میگو بین ۷۵ تا ۸۰ درصد گزارش شده است (Yanar and Celik 2006, 94; Sambhu and Jayaprakash 1994, 23). در بررسی Gunalan و دیگران (۲۰۱۳) درصد رطوبت عضله میگوی وانامی ۷۶/۲ بیان گردید. درصد خاکستر نیز ۱/۲ اعلام نمود. به‌طور کلی درصد خاکستر در میگو ۱/۵ تا ۱ درصد می‌باشد. Gokoglu و دیگران (۲۰۰۸) و Yanar و Celik (۲۰۰٦) اعلام نمودند که میزان

خاکستر در میگوهای مونودون و وانامی به ترتیب ۰/۹۵ و ۱/٤۷ درصد می‌باشد. هم‌چنین Gunalan و دیگران (۲۰۱۳) درصد خاکستر در میگوی وانامی را ۱/۲ درصد اعلام کردند. در این بررسی میزان خاکستر، در تیمارهای مختلف حدود ۱/۵ محاسبه شده که به یافته‌های فوق نزدیک می‌باشد. از آن‌جا که محتویات خاکستر شامل پروتئین، کربوهیدرات و مواد معدنی بوده و میزان پروتئین در تیمارهای مختلف تقریباً یکسان است، این احتمال وجود دارد که مصرف پروبیوتیک‌ها باعث افزایش تجمع مینرال‌ها در عضله میگوها شده است. در واقع ممکن است پروبیوتیک‌ها منجر به تحریک دستگاه گوارش به جذب بیش‌تر مواد معدنی مانند ید و کلسیم شده باشد.

بیش‌ترین مقدار چربی در تیمار شاهد و کم‌ترین آن در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده شد. این فاکتور شاید نشان دهنده‌ی هضم و جذب بهتر مواد غذایی باشد. از آن‌جایی که کلسترول موجود در میگوها نسبتاً بالا است، ممکن است نشانه‌ی خوبی در هضم چربی و سالم‌تر بودن گوشت آن باشد.

۵-۷- فلور باکتریایی

باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش ماهیان وجود دارند (Ringø and Gatesoupe 1998, 177)، اگرچه در بیش‌تر مطالعات انجام شده بر روی فلور روده میگو، به‌طور کلی سخت‌پوستان، حضور باکتری‌های اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش گزارش نشده است (Dempsey et al 1989, 56; Harris 1993, 25; Oxley and Shipton 2002, 93; Venkat et al 2004, 35). ولی Cai و دیگران (۱۹۹۹) حضور سه گونه باکتری *Lactococcus garvieae*، *P. acidilactici* و *Enterococcus faecium* را در میگوی آب شیرین (*M.rosenbergii*) شناسایی و جداسازی نمودند.

در بررسی حاضر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک شمارش شده در گروه شاهد (و حتی گروه ویتامین C) بر روی محیط کشت MRS نشان دهنده‌ی عدم حضور طبیعی باکتری‌های اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش میگوی وانامی بود، در حالی که در تیمارهای پروبیوتیکی مخصوصاً تیمار پدیوکوکوس، کلونی‌های سفید خاکستری متمایل به زرد کم رنگ با سطح تقریباً صاف و قطر حدود ۱ تا ۳ میلی‌متر که پس از انجام تست کاتالاز- اکسیداز به باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت داده شد، در سطح محیط کشت به وفور مشاهده گردید. نتایج بررسی حاضر با ملاحظات Castex و دیگران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. این موضوع ثابت می‌کند که سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی توانسته‌اند شرایط دستگاه گوارش میگو را تحمل نموده و زنده بمانند که از ویژگی‌های مهم پذیرفتن یک پروبیوتیک و معرفی آن جهت اصلاح شرایط پرورش گونه مورد نظر است (Panigrahi et al 2005, 243). هم‌چنین پس از استقرار در دستگاه گوارش، توانستند به خوبی گسترش یافته و به طور قابل توجهی توسعه یابند. این ویژگی سبب می‌شود تا باکتری پروبیوتیک با بلوکه کردن

گیرنده‌های اتصال، رقابت برای مواد مغذی و تولید مواد ضدمیکروبی، از تهاجم عوامل بیماری‌زا در میزبان جلوگیری نماید (Servin 2004, 28). Nikoskelainen و دیگران (۲۰۰۳) نشان می‌دهد که معمولاً چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک به سطوح مخاطی مختص گونه نیست. در تأیید یافته‌های تحقیق Kumar و دیگران (۲۰۱۳) و Fernanez و دیگران (۲۰۱۱) نشان دادند که تعداد باکتری‌های کل و اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش میگوهای وانامی و هندی تغذیه شده با مکمل‌های پروبیوتیکی به‌طور معنی‌داری بیش از تیمار شاهد بودند.

Ringø و Gatesoupe (۱۹۹۸) اظهار داشتند که باکتری‌هایی که توانایی تولید تخمیر اسیدلاکتیک دارند، ممکن است تکثیر و گسترش میکروب‌ها در دستگاه گوارش موجودات آبزی را مهار کرده، در نتیجه به بهبود سلامت میزبان کمک کنند. در واقع اثرات اولیه باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق کاهش pH اعمال می‌شود (Daeshel 1989, 43). برخی از محققین نیز اعلام نمودند که از میان مواد تولید شده خارج سلولی توسط پروبیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها دارای بیش‌ترین اهمیت می‌باشند (Gildberg et al 1997, 352).

باکتریوسین‌ها (پدیوسین) توسط برخی از سویه‌های *P. acidilactici* ترشح می‌شوند (Bhunia et al 1990, 69; Cintas et al 1995, 61; Mora et al 2002, 44). پدیوکوکوس دارای توانایی تولید مقادیر فراوانی اسیدلاکتیک است (Castex et al 2008, 275). اسیداستیک و اسیدلاکتیک تولید شده به‌وسیله‌ی تخمیر باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به اسیدی کردن محیط و خروج یون‌های H^+ از سلول‌ها شده که در نهایت منجر به کاهش اسیدیته محیط می‌گردد (Goncalves et al 1997, 48). از این‌رو می‌توان این فرضیه را مطرح نمود که سویه پدیوکوکوس و لاکتوکوکوس مورد مطالعه ممکن است موادی را تولید کرده که باعث تغییر در فلور روده‌ی میگو می‌گردد.

Aubin و دیگران (۲۰۰۵) تأکید نمودند که اثر پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌طور مستقیم به علت خواص باکتریایی و یا به طور غیرمستقیم به‌وسیله تحریک فلور روده توسط پروبیوتیک مربوط باشد. برای مثال Vázquez و دیگران (۲۰۰۵) نشان دادند که اسیداستیک و اسیدلاکتیک تولید شده توسط پروبیوتیک‌های اسیدلاکتیک، مسئول مهار نمودن چهار نوع عامل بیماری‌زای رایج در ماهی توربوت می‌باشند. به نظر می‌رسد تولید باکتریوسین‌ها و یا اسیدی شدن توسط اسید لاکتیک فرضیه مناسبی است که می‌تواند رفتار پروبیوتیک‌ها را در فلور روده توجیه کند.

در بررسی Zhang و دیگران (۲۰۰۹)، تعداد باکتری‌های روده ۲۴ ساعت پس از مصرف پروبیوتیک دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل بود که با یافته‌های Robertson و دیگران (۲۰۰۰) و Panigrahi و دیگران (۲۰۰۵) هم‌سو می‌باشد. نتایج بررسی حاضر حاکی از آن است که ترکیب و میزان باکتری‌های غالب در دستگاه گوارش میگوی وانامی شدیداً تحت تأثیر مکمل‌های پروبیوتیکی قرار می‌گیرد. هرچند بایستی در

مورد میزان ورود، امکان چسبیدن و کلونیزه شدن باکتری‌ها در دستگاه گوارش میگو تحقیقات بیش‌تری انجام گردد.

یکی از شبهات اصلی در مصرف مواد محرک رشد مانند پروبیوتیک‌ها و ویتامین‌ها در آبزیان چه به صورت خوراکی و چه به صورت افزودنی به آب، عدم اطمینان از میزان ورود به درون بدن، کارایی و توانایی اثرگذاری و قدرت ماندگاری در دستگاه گوارش است. برای مثال Rengpipat و دیگران (۲۰۰۰) اعلام کردند که محدوده غلظت باکتری در روده میگوی مونودون که دارای غلظت اولیه $۱/۳۹ \times ۱۰^{۱۰}$ CFU g^{-1} و $٤/٦٩ \times ۱۰^{۱۰}$ در غذای مورد استفاده بود، $۱۰^{٦}$ CFU g^{-1} محاسبه گردید. Ziaei-Nejad و دیگران (۲۰۰٦) نیز گزارش نمودند که غلظت پروبیوتیک‌های تجاری محاسبه شده در دستگاه گوارش میگوی هندی $۱۰^{٤}$–$۱۰^{٥}$ CFU g^{-1} به دست آمد، در حالی که با غلظت اولیه $۱۰^{۷}$ CFU ml^{-1} به آب پرورش افزوده شده بود.

Ringø و Gatesoupe (۱۹۹۸) گزارش کردند که باکتری‌های اسید لاکتیک که از طریق غذا به دستگاه گوارش ماهیان وارد شده بود، در موکوس روده‌ای کلونیزه نشده و طی عبور از دستگاه گوارش و پس از هضم غذای حاوی پروبیوتیک، از دست می‌روند. Aubin و دیگران (۲۰۰۵) در تأیید یافته‌های مذکور اعلام کردند که تعداد کلونی‌های گونه‌های مشابه *P. acidilactici* در دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از ۲۰ ساعت قطع تغذیه، به غلظتی کم‌تر از $۱۰^{۲}$ CFU رسید. این نگرانی در مورد میگو حادتر است. به نظر می‌رسد روده بسیار کوتاه و عبور سریع مواد غذایی در دستگاه گوارش میگو (Dall 1967, 15) می‌تواند علت حذف سریع پروبیوتیک‌ها در مقایسه با ماهی‌ها باشد. علاوه بر این دمای آب نیز از عوامل موثر در سرعت عبور مواد غذایی در دستگاه گوارش میگو می‌باشد (Chim et al 2004, 102). با توجه به فصل پرورش میگوی وانامی (تابستان) و وضعیت آب و هوایی استان خوزستان به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها و ویتامین C افزوده شده به غذا، به سرعت از دستگاه گوارش عبور نموده و مقدار زیادی قبل از چسبیدن به دستگاه گوارش خارج می‌شوند.

جهت جبران کاهش مواد پروبیوتیکی در اثر مواجهه با آب، عبور سریع مواد غذایی در دستگاه گوارش و به تبع آن خروج پروبیوتیک‌ها و ویتامین C از روده، این مواد باید در طول دوره‌ی پرورش به‌طور مرتب از طریق غذا و یا آب در دسترس موجود قرار گرفته و وارد دستگاه گوارش میگو شده تا حضور این مواد و تأثیرشان بر سیستم ایمنی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و در نهایت بر شاخص‌های رشد و بقا، مداوم باشد.

اصلاح در فلور میکروبی روده می‌تواند ابزاری مهم جهت جلوگیری از بروز بیماری از طریق اشغال جایگاه‌های اکولوژیکی توسط باکتری‌های مفید باشد که بدین ترتیب از تثبیت احتمالی عوامل بیماری‌زا

اجتناب کنند (Gómez-Gil et al 2000, 191). در این مطالعه مشاهده شد که بین استقرار باکتری در روده‌ها و تحریک پاسخ‌های ایمنی میگوی وانامی رابطه قوی وجود دارد.

در بررسی حاضر جمعیت باکتری‌های روده میگوهای وانامی تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند، به طوری که تیمار پدیوکوکوس بیش‌ترین میزان ماندگاری باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی را بین تیمارها داشت. این افزایش ممکن است به دلیل تغییر قابل توجه در نسبت باکتری‌های موجود در فلور روده و محدود شدن سایر باکتری‌ها (به‌خصوص باکتری‌های مضر) توسط پروبیوتیک‌ها باشد. در توجیه این یافته باید در نظر داشت که نفوذ به درون لایه‌ی مخاطی، ویژگی استقرار پروبیوتیک در روده‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از آن‌جایی که لایه مخاطی به طور مداوم در حال تجدید شدن است، ارگانیسم‌هایی که بتوانند عمیقاً در مخاط نفوذ کنند، قادرند روی روده‌ها استقرار یابد (محمدیان ۱۳۹۲، ۱۳۹). به نظر می‌رسد استفاده از ویتامین C باعث تغییر چندانی در تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک دستگاه گوارش میگوهای وانامی نشده است. شاید این موضوع توجیه عدم کارایی سیستم ایمنی (نظیر فعالیت فنول اکسیداز و میزان پروتئین‌های همولنف)، فعالیت برخی آنزیم‌ها و در نهایت رشد کم‌تر تیمار ویتامین C در مقایسه با تیمارهای پروبیوتیکی باشد.

۵-۸- بافت‌شناسی

مانند سایر موجودات، روده فاز نهایی چرخه جذب و هضم در میگوها می‌باشد. هضم، پردازش و جذب موادی که از معده خارج می‌شود، در روده انجام شده که در نهایت، مواد زائد باقی‌مانده را حذف می‌کند. اپیتلیوم روده، لایه‌ی فعالی است که جریان آب و انتقال یون را تنظیم می‌کند (Icely and Nott 1992, 151). آبزیان محدوده‌ی مکانیسم‌های حفاظتی را توسعه داده‌اند تا مانع چسبیدن عوامل بیماری‌زا، انتقال و در نهایت عفونت دستگاه گوارش شوند. باکتری‌های مضر ممکن است نفوذپذیری را افزایش دهند، بنابراین امکان عبور باکتری‌ها و ماکرومولکول‌های غذایی از طریق دیواره‌ی مخاطی روده وجود دارد (Lee et al 2000, 16). مخاط روده‌ای اولین سد جهت جلوگیری از حملات عوامل بیماری‌زا است (Tlaskalova´-Hogenova´ et al 2004, 93). لایه مخاطی به واسطه‌ی داشتن محدوده‌ای از ترکیبات فعال (مانند آنتی‌بادی‌ها، پپتیدها ضدباکتری، لیزوزیم‌ها، مکمل‌های پروتئین و لکتین‌ها) سد ضدمیکروبی موثری را به وجود آورده است (Saurabh and Sahoo 2008, 39; Dalmo et al 1997, 20).

Pirarat و دیگران (۲۰۱۱) در تحقیق خود عنوان نمودند که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک دارای ریزپرزهای[1] طویل‌تری نسبت به گروه کنترل هستند و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و نهایتاً

[1] Villi

باعث افزایش جذب می‌شود (Caspary 1992, 55). هم‌چنین پروبیوتیک‌ها باعث تحریک تکثیر سلول‌های اپیتلیالی دستگاه گوارش می‌گردند (Ichikawa et al 1999, 44).

پروبیوتیک‌ها پس از رسیدن به روده شروع به تکثیر کرده و از قندها جهت رشد خود و تولید مواد سازنده‌ی اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه استفاده می‌کنند. این اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه احتمالاً نقش مهمی در افزایش طول ریزپرزهای روده دارند (Pelicano et al 2005, 7). اسیدهای چرب غیراشباع زنجیره کوتاه به خصوص اسید بوتریک به عنوان اصلی‌ترین منبع انرژی برای سلول‌های اپیتلیال روده محسوب می‌شود. هم‌چنین اسید بوتریک می‌تواند باعث آزادسازی پپتیدهای روده‌ای و فاکتورهای رشدی شوند که در تکثیر سلول‌های اپیتلیالی موثرند (Blottiere et al 2007, 62).

برخی مطالعات نشان‌دهنده‌ی ارتقای مقاومت آبزیان در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش مخاط روده، تعداد سلول‌های اپتلیوم و سلول‌های جامی بودند (Picchietti et al 2007, 22; 2009, 26). Harper و دیگران (۲۰۱۱) نیز افزایش لایه مخاطی و سلول‌های جامی را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در اثر مصرف *Pediococcus acidilactici* به صورت خوراکی گزارش کردند.

در بررسی Zhang و دیگران (۲۰۰۹) یک‌دستی و یکپارچگی اپیتلیوم روده میگوی چینی در تیمارهای پروبیوتیکی بهتر مشاهده شده، هم‌چنین مصرف پروبیوتیک به صورت خوراکی از یکپارچگی لایه مخاطی روده محافظت کرده و به‌طور موثر از ورود عوامل بیماری‌زا جلوگیری کرده است. همچنین افزایش ارتفاع سلول‌های اپیتلیوم بافت روده در میگوی وانامی و ماهی سیم دریایی گزارش شده است (Abedian et al 2013, 94; Borda et al 2003, 11).

در بررسی حاضر تعداد سلول‌ها و ضخامت اپیتلیوم روده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیش‌ترین تعداد سلول‌ها در تیمار لاکتوکوکوس و بیش‌ترین ضخامت این لایه در تیمار پدیوکوکوس مشاهده شد. در تیمارهای پروبیوتیکی، سلول‌ها دارای هسته بزرگ‌تر، کشیدگی و چین‌خوردگی بیش‌تری بودند. در این بررسی، استفاده از ویتامین C در جیره غذایی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر بافت روده میگوهای وانامی نداشته است، هر چند اندکی افزایش در تعداد و ضخامت لایه اپیتلیوم مشاهده شد و مانند بافت روده تیمار شاهد، سلول‌ها در یک ردیف به صورت کم و بیش مستقیم و یک‌دست، بدون کشیدگی و چین‌خوردگی و با اندازه نرمال مشاهده شدند. به نظر می‌رسد افزایش تعداد انتروسیت‌ها، چین‌خوردگی و ضخامت لایه اپیتلیوم باعث ارتقای کارایی دستگاه گوارش در هضم مواد غذایی و جذب بیش‌تر مواد مغذی موجود در غذا گرددیده است. این افزایش جذب در نهایت می‌تواند توجیه مناسبی برای افزایش وزن میگوها در تیمارهای پروبیوتیکی باشد که با یافته‌های محققان فوق هم‌سو است.

۵- ۹- نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق به عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان داشت که عمل‌کرد پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک و در مواردی ویتامین C قابل قبول بوده است. با توجه به حساسیت‌های موجود در صنعت پرورش میگوی کشور نظیر راندمان پایین تولید در واحد سطح، شیوع بیماری‌ها و گاهی تلفات صددرصدی مزارع پرورش، مکمل‌های غذایی می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و به طور گسترده در مقیاس تجاری استفاده شوند. همچنین از لحاظ اقتصادی نسبت به مواد شیمیایی مقرون به صرفه بوده، ضمن کاهش هزینه‌ها و آثار مخرب زیست محیطی، نتایج مطلوبی نیز به همراه دارند. در این میان پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی در مقایسه با دو مکمل دیگر، تأثیرات مطلوب‌تری بر بهبود کلی سلامت میگوی وانامی داشته است.

۵-۱۱- پیشنهادات

- بررسی اثرات پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر سایر بافت‌های دستگاه گوارش نظیر هپاتوپانکراس (مطالعات هیستوشیمی)
- چالش با سایر عوامل بیماری‌زا نظیر ویروس لکه‌سفید و بررسی اثرات مکمل‌ها
- بررسی اثرات پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رشد و آنزیم‌های گوارشی بدن
- بررسی اثرات پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی در بافت‌های مختلف و عوامل بیماری‌زای دیگر
- بررسی اثرات توأم پروبیوتیک‌های مطالعه حاضر با ویتامین C یا پری‌بیوتیک‌های مختلف بر فاکتورهای رشد، پاسخ‌های ایمنی در میگوی وانامی

فهرست منابع فارسی

۱. افشارنسب، محمد. عباس. متین‌فر، مهرداد. محمدی‌دوست، ع. قوام‌پور، رضا. سیدمرتضایی، سیما. سبزعلی‌زاده، محمد خلیل. پذیر، غ. فقیه، م. حق‌نجات، و ش. قاسمی، ۱۳۸۷. تعیین نرخ رشد، میانگین وزن، میزان بقاء، ضریب تبدیل غذایی و تولید کل در پرورش میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) در ایران. مجله علمی شیلات ایران، سال هفدهم، شماره ۳، ص. ۲۲-۱۵

۲. پروانه، ویدا. ۱۳۷۷. کنترل کیفی و آزمایشهای مواد غذایی. تهران: دانشگاه تهران.

۳. پورفرهادی، مسعود. ۱۳۹۱. بررسی اثر سطوح مختلف مخلوط پروبیوتیک و پریبیوتیک (سین بیوتیک Biomin IMBO) بر برخی فاکتورهای ایمنی، پارامترهای رشد و بازماندگی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، ۸۰ صفحه.

٤. رحمتیاندانی، حمیدرضا. امیر. توکمهچی، سعید. مشکینی، هادی. ابراهیمی، ۱۳۸۹. افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری با استفاده از لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران دوره هفتم، شماره دوم.

۵. زرشناس، غلام‌عباس. و محمد خلیل. پذیر، ۱۳۸۶. معرفی و انتقال میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) و میگوی آبی (*Penaeus stylirostrys*) به آسیا و اقیانوسیه. ترجمه. مؤسسه تحقیقات شیلات. ۱۷۳ صفحه.

٦. سازمان استاندارد ایران. گوشت و فرآورده های آن– تعیین مقدار خاکستر کل –روش آزمون(تجدید نظر). استاندارد شماره ٧٤٤.

۷. سازمان استاندارد ایران. اندازه‌گیری پروتئین تام در گوشت و فرآورده‌های آن–روش آزمون(تجدید نظر). استاندارد شماره ۹۲٤.

۱. سلطانی، مهدی. ۱۳۸٦. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان .انتشارات دانشگاه تهران، 259 صفحه.

۸. شهبازی، پرویز. و ناصر. ملک‌نیا، ۱۳۷۵. بیوشیمی عمومی برای دانشجویان دانشکده‌های گروه پزشکی، جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران. ٤۷۲ صفحه.

۹. صالحی، حسن. ۱۳۸٦. تحلیل اقتصادی تولید میگوی سفید هندی (*Fenerropenaeus indicus*) در استان‌های جنوبی ایران. مجله علمی شیلات ایران، سال شانزدهم، ص. ۱۱٦-۱۰۳.

۱۰. ضیایی‌نژاد، سعید. ۱۳۸۲. بررسی تأثیر باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیم‌های گوارشی در مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی (*Fenneropeaneus indicus*) طرح تحقیقاتی دانشگاه زابل.

۱۱. عسکری‌ساری، ابوالفضل. عباس. متین‌فر، و ع. م. عابدیان، ۱۳۸۷. آثار متقابل سطوح مختلف درجه شوری آب و میزان پروتئین غذا بر رشد و بازماندگی میگوی جوان وانامی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران، سال هفدهم، شماره ۱، ص. ۱۱۶-۱۰۹.

۱۲. غفله‌مرمضی، جاسم. تیرداد. مقصودلو، و اسماعیل. پقه، ۱۳۸۹. تاثیر سطوح مختلف انرژی و منابع پروتئینی بر رشد، تغذیه، بازماندگی و ترکیب شیمیایی بدن میگوی سفید غربی نوجوان (*Litopenaeus vannamei*). سومین همایش میگوی ایران. ١٤ و ١٥ آذر ماه ۱۳۸۹. بوشهر، خلاصه مقالات، ص. ۳۷.

۱۳. کریم‌زاده، صادق. اسدالله. تیموری‌یانسری، و قاسم. کریم‌زاده، ۱۳۸۸. فواید و کاربرد پروبیوتیک ها در تغذیه دام، طیور و آبزیان. انتشارات آوای مسیح، ١٧٤ صفحه.

١٤. محمدیان، تکاور. ۱۳۹۲. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک‌کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*). دانشگاه شهید چمران اهواز، پایان‌نامه دکتری، ۱۸۵ صفحه.

فهرست منابع غیر فارسی

1. Abdel-Salam H A, Hamdi A H S. 2011. Biochemical compositions and heavy metals accumulation capacity of the marine mantis shrimp *Erugosquilla massavensis* from the Suez Canal (El- Suez and Ismailia) Egypt. Journal of the Egyptian German Society of Zoology. 61:199-214.
2. Abdel-Salam H A. 2013. Evaluation of nutritional quality of commercially cultured Indian white shrimp *Penaeus indicus*. International Journal of Nutrition and Food Sciences. 2(4): 160-166.
3. Abedian-Kenari A M, Oujifard A. 2013. Growth, Lipid Metabolism and Intestinal Absorbance of White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei* Boone 1931) Influenced by Dietary Nucleotide. 2nd International Conference on Environment, Agriculture and Food Sciences (ICEAFS'2013) August 25-26, 2013 Kuala Lumpur (Malaysia), PP.94-98.
4. Akinbowale O L, Peng H H, Barton M D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology. 100: 1103–1113.
5. Alam S M N, Pokrant B, Yakupitiyage A. Phillips M J. 2007. Economic returns of disease affected extensive shrimp farming in southwest Bangladesh. Aquaculture International. 14: 363–370.
6. Alavandi S V, Vijayan K K, Santiago T C, Poornima M, Jithendran K P, Ali S A, Rajan J J S. 2004. Evaluation of *Pseudomonas sp.* PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology. 17: 115-120.
7. Ali A. 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Ph.D Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea, Sweden.
8. Alishahi M, Ranjbar MM, Ghorbanpour M, Peyghan R, Mesbah M, Razijalali M. 2010. Effects of dietary Aloevera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research. 4 (3): 85-91.
9. Amar E C, Kiron V, Satoh S, Watanabe T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology. 16: 527-537.
10. Anson M L. 1938. Journal of General Physiology. 22: 79-89.
11. Aubin J, Gatesoupe F J, Labbe L, Lebrun L. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). Aquaculture Research. 36: 758–767.
12. Austin B, Austin D A. 1999. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish, Fourth ed. Springer, Bristol. Pp. 121-129.
13. Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology. 140: 310-317.
14. Avall-Jaaskelainen S, Palva A. 2005. Lactobacillus surface layers and their applications. FEMS Microbiology Reviews. 29: 511-529.
15. Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: classication and physiology. In Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects 2nd edn. (Eds S. Salminen and A. wonWright) pp. 1-72. NewYork, Marcel Dekker Inc.
16. Balcazar J L., Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vandrell D, Muzquiz J L. 2006. Review: The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 114: 173-186.

17. Balca´zar J L, Rojas-Luna T, Cunningham D P. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology. 96: 147–150.
18. Barros R R, Carvalho G S, Peralta J M, Facklam R R, Teixeira L M. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of Pediococcus strains isolated from human clinical sources. Journal of Clinical Microbiology. 39(4): 1241–1246.
19. Bej A K, Patersson D P, Brasher C W, Vickery M C L, Jones D D, Kayysner C A. 1999. Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish. Methods in Microbiology. 36: 215-225.
20. Bello-Olusoji A M, Balogun O, Fagbenro A, Ugbaja N. 1995. Food and feeding studies of the African river prawn. In: Proceedings of Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Lavens P., Japan E. and Roelants, I. (Eds.). European Aquaculture Soceity. 24: 425-427.
21. Bernfeld P. 1951. Amylases α and β. In methods in enzymology, vol.1 (Colowick, P & Kaplan, N.O.,eds), pp: 149-157.New York: Academic press.
22. Bhavan S, Saravana S, Radhakrishnan S, Shanthi R, Poongodi R. 2010. Proximate composition and profiles of amino acids and fatty Acids in the muscle of adult males and females of commercially viable prawn species *Macrobrachium rosenbergii* collected from natural culture environments. International Journal of Biology. 2 (2):107-119.
23. Bhunia A K, Johnson M C, Ray B, Belden E L. 1990. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology. 69: 211–215.
24. Blottiere H M, Buecher B, Galmiche J P, Cherbut C. 2007. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. Proceedings of the Nutrition Society. 62: 101–106.
25. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich S D, Sorokin A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. lactis IL1403. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 11 (5): 731-753.
26. Borda E, Martinez-Puig D, Cordoba X. X. 2003. A balanced nucleotide supply makes sense. Feed Mix. 11: 24– 26.
27. Boyd C D, Hollerman W D, Plum J A, Saeed M. 1984. Effect of treatment with a commercial bacterial suspension on water quality on channel catfish pond. Progress in Fish Culture. 46:36- 40.
28. Boyd C E, Tucker C S. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers, USA.
29. Boyd C E, Massaaut L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering. 20: 113–132.
30. Boyd C E, Tucker C, Mc Nevin A, Bostick K, Clay J. 2008. Indicators of resource use efficiency and environmental performance in fish and crustacean aquaculture. Reviews in Fisheries Science. 4: 327–360.

31. Braat H, Rottiers P, Hommes D W, Huyghebaert N, Remaut E, Remon J P, van Deventer S J, Neirynck S, Peppelenbosch M P, Steidler L. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 4 (6): 754–759.
32. Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72: 248-254.
33. Briggs M, Smith S F, Subasinghe R, Phillips M. 2004. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and Pacific. Food and agriculture organization of the United Nations regional office for Asia and Pacific, Bangkok, 79p.
34. Brock J A, Lea Master B. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming (Wyban, J. ed), pp 212–226, World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, USA.
35. Cahu C L, Zambonino Infante J L, Quazuguel P, Le Gall M M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. 171:109–119.
36. Cahu C L, Zambonino Infante J L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture. 200: 161–180.
37. Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General Applied Microbiology. 45: 177–184.
38. Cara J B, Moyano F J, Cardenas S, Fernandez-Diaz C, YuferaM. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Fish biology. 63: 48-58.
39. Caspary W F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. The American Journal of Clinical Nutrition. 55: 299S-308S.
40. Castex M, Chim L, Pham D, Lemaire P, Wabete N, Nicolas J L, Schmidely Ph, Mariojouls M. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Aquaculture. 275:182-193.
41. Castex M, Lemaire P, Wabete N, Chim L. 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture. 294:306-313.
42. Castex M, Lemaire P, Wabete N, Chim L. 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish and Shellfish Immunology. 28: 622-631.
43. Chiauvareesajja S, Boyd C D. 1993. Effect of zeolite, formalin, bacterial augmentation and aeration on total ammonia nitrogen concentrations. Aquaculture. 116: 33-45.
44. Chim L, Galois R, Martin J L M, Lemaire P, Wabete N, Massabuau J C, Cuzon G. 2004. Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution de l'aliment en fonction de la saison d'élevage. Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (Ed. Ifremer), Actes Colloq, pp. 99–105.
45. Chiu C H, Guu Y K, Liu C H, Pan T M, Cheng W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish and Shellfish Immunology. 23:364-77.
46. Choi SH, Park K H, Yoon T J, Kim J B, Jang Y S, Choe C H. 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish and Shellfish Immunology. 24:67-73.

47. Cintas L M, Rodriguez J M, Fernandez M F, Sletten K, Nes F, Hernandez P E, Holo H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Applied and Environmental Microbiology. 61:2643–2648.
48. Clerton P, Troutaud D, Verlhac V, Gabraudan J, Deschaux P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiis*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and shellfish Immunology. 11: 1-13.
49. Crane R K, Boge G, Rigal A. 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 554: 264-267.
50. Dabrowski K. 1990. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). Aquaculture. 84: 61-70.
51. Daeschel M A, Klaenhaemmer T R. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Applied and Environmental Microbiology. 50: 1538S-1541S.
52. Daeshel M A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology. 43: 164–167.
53. Dall W. 1967. The functionnal anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettae* (Racek & Dall). Australian Journal of Zoology. 15: 699–714.
54. Dalmo D A, Ingebrigtsen K, Bøgwald J. 1997. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases. 20: 241-273.
55. Darias M J, Mazurais D, Koumoundouros G, Cahu C L, Zambonino-Infante J L. 2011. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. Aquaculture. 315 (1–2): 49-60.
56. Darvishpour H, Yahyavi M, Mohammadizadeh F, Javadzadeh M. 2012. Effects of Vitamins A, C, E and their Combination on Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Post *Larvae.* Advanced Studies in Biology. 4 (5): 245- 253.
57. Decamp O, Moriarty D J W, Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research. 39:334-8.
58. Dempsey A C, Kitting C L, Rosson R A. 1989. Bacterial variability among individual peneid shrimp digestive tracts. Crustaceana. 56 (3): 267–278.
59. Ehigiator F A R, Oterai E A. 2012. Chemical composition and amino acid profile of a caridean prawns (*Macrobrachium vollenhoveanil*) from Ovia River and tropical periwinkle (*Tympanonus fusctus*) from Benin River, Edo state, Nigeria. International journal of Research and Reviews in Applied Sciences. 11 (1):162-167.

60. Eldered B, Hutton R F. 1960. On the grading and identification of domestic commercial shrimp (family penaeidae) with a tentatire world list of commercial penaeid. Quarterly journal of the Florida Academy of Sciences. 23 (2): 89-118.

61. Ellis A E. 1990. Lysozyme Assays. Techniques in Fish Immunology. Pp.101-103.
62. Erlanger B F, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95: 271-278.
63. Esiobu N, Armenta L, Ike J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. International Journal of Environmental Health Research. 12: 133–144.

64. Ferguson R M W, Merrifield D L, Harper G M, Rawling M D, Mustafa S, Picchietti S, Balcázar J L, Davies S J. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Microbiology. 109 (3):851-62.
65. Fernandez R, Sridhar M, 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.
66. Fuller R. 1989. Probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365–378.
67. Galindo-Villagas J, Hosokawa H. 2004. Immunostimulants: Towards temporary prevention of disease in marine fish. In: Proceeding of the 7th international symposium of Nutrition of aquaculture, Sonora, Mexico. pp. 291-319.
68. Garriques D, Arevalo G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. Proceedings of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society. San Diego, Ca, USA pp.53-59.
69. Gatesoupe F J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180: 147–165.
70. Gatlin D M. 2002. Nutrition and fish health. In: Fish Nutrition. (ed. By J.E Halver and R.W. Hardy), pp. 671-702, Academic Press, SanDiego, CA.
71. Ghosh S, Sinha A, Sahu C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. Aquaculture Research. 38: 518–526.
72. Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E, Ringø E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. Hydrobiologia. 352: 279–285.

73. Gill H S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. 17: 755-73.

74. Gokoglu N, Yerlikaya P, Gokoglu M. 2008. Mini-review. Trace elements in edible tissue of three shrimp species (*Penaeus semisulcatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Paleomon serratus*). Journal of the Science of Food and Agriculture. 88:175-178.

75. Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larvalaquatic organisms. Aquaculture. 191: 259–270.

76. Gomez-Jimenez S, Gonzalez-Felix M L, Perez-Velazquez M, Trujillo- Villalba D A, Esquerr- Brauer I R, Barrazaguardado R. 2005. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* Boone raised in a zero water exchange culture system. Aquaculture Research. 36: 834-840.

77. Goncalves L M D, Ramos A, Almeida J S, Xavier A M R B, Larrondo M J T. 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 48: 346–350.

78. Griffith D R W. 1995. Microbiology and the Role of Probiotics in Ecuadorian Shrimp Hatcheries. In: Larvi'91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Lavens, P., E. Jaspers and I.Roelands (Eds.). Special Publication No. 24. European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp.478.

79. Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 233: 1–14.
80. Gunalan B, Nina Tabitha S, Soundarapandian P, Anand T. 2013. Nutritive value of cultured white leg shrimp *Litopenaeus vannamei.* International Journal of Fisheries and Aquaculture. 5(7): 166-171.
81. Halver J E. 1995. Vitamin requirement study techniques. Journal of Applied Ichthyology. 11: 215-224.
82. Harper G M, Monfort M, Saoud I P, Emery M, Mustafa S. 2011. An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Aquaculture Research and Development. S1:004.
83. Harris J M. 1993. The Presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microbiology and Ecology. 25: 195–231.
84. He H, Lawrence A L. 1993. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei.* Aquaculture. 114 (4): 305-316.
85. Hidalgo M C, Urea E, Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits, Proteolitic and amylase activities. Aquaculture. 170: 267-283.
86. Hsu T S, Shiau S Y. 1998. Comparison of vitamin C requirement for maximum growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*, using L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. Aquaculture. 163: 203–213.
87. Hummel B. 1959. A Modified Spectrophotometric Determination of Chymotrypsin, Trypsin and Thrombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37: 1393.
88. Icely J D, Nott J A. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. In Microscopic Anatomy of Invertebrates, vol. 10, Decapod Crustacea (ed. F. W. Harrison and A. G. Humes), pp. 147–201. New York, NY: Wiley Liss.
89. Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S, Sakata T. 1999. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Digestive Diseases and Sciences. 44: 2119–2123.
90. Irianto A, and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25*:* 633-642.
91. Javadi A, Mirzaei H, Khatibi S A, Zamanirad M, Forogeefard H, Abdolalian I. 2011. Effect of Dietary Probiotic on Survival and Growth of *Penaeus indicus* Cultured Shrimps. Journal of Animal and Veterinary Advances. 10 (17): 2271-2274.
92. Jobling M. 1995. Digestion and absorption. In: Jobling, M. (Ed), Environmental biology of fishes, Chapter 6. Chapman & Hall, London England. Pp. 175-210.
93. Karakoltsidis P A, Zotosand A, Constantinides S M. 1995. Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans and mollusks. Journal of Food Composition and Analysis. 8: 258-273.
94. Kitani H. 1986. Larval development of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stage. Bulletin of Japanese society of scientific fisheries. 25(7): 1131-1139.
95. Klaenhammer T R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12: 39S-85S.
96. Kumar P N J, Jyothsana S, Reddy M H, Sreevani S. 2013. Effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus rhamnosus* incorporated probiotic diet on growth pattern and

enzymes in *Penaeus vannamei*. International journal of life science and pharma research. 3 (4): 6-11.
97. Kumlu M, Jones D A. 1995. The effect of live and artificial diets on growth, survival, and trypsin activity in larvae of *Penaeus indicus*. Journal of World Aquaculture Society. 26: 406-415.
98. Kuz'mina V V, Skvortsova E G. 2001. Activity of proteolytic enzymes of potential prey of predatory fish influence of natural and anthropogenic factors. Journal of Ichthyology. 41(3): 246-254.
99. Kuz'mina V, Shekovtsova N, Bolobonina V. 2010. Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biology Bulletin. 37: 605-611.
100. Lara F M, Olvera-Novoa M A, Guzmán-Méndez B E, López- Madrid W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216: 193–201.
101. Lee D J, Drongowski R A, Coran A G, Harmo C M. 2000. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. Pediatric Surgery International. 16:237–242.
102. Lee M H, Shiau Sh. Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon. Fish & Shellfish Immunology* (2002) 12: 119–129.
103. Lemos D, Rodriguez A. 1998. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. Aquaculture. 160: 103-116.
104. Le Moullac G, Klein B, Sellos D, Van Wormhoudt A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 208: 107-125.
105. Leung K M Y, Dudgeon D. 2008. Ecological risk assessment and management of exotic organisms associated with aquaculture activities. In: Understanding and Applying Risk Analysis in Aquaculture (Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R. & Subasinghe, R.P. eds), pp 67–100. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 519. FAO, Rome.
106. Le Vay L, Rodriguez A, Kamarudin M S, Jones D A. 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicas* larvae. Aquaculture. 118: 287-297.
107. Li J T, Lee P P, Chen O C, Chen W. 2005. Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunology. 19:269–280.
108. Li J. 2008. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium Arthrobacter XE-7 in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society. 39:477-89.
109. Li J, Tan B, 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.
110. Li K F, Chiu Ch H, Shiu Y L, Cheng W, Liu Ch H. 2010. 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: 837-844.
111. Lightner D V. 1975. Some potentially serious problems in the culture of penaeid shrimp in North America. Proc. US-Japan National Recourse programme, Symposium on Aquaculture Diseases, Tokyo, pp. 75-97.
112. Lightner D V. 2003. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. In: Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species: Proceedings of the 32nd U.S.-Japan Cooperative Program in Natural Resources (Sakai, Y., McVey, J.P., Jang, D., McVey, E. & Caesar, M. eds), pp 1–20, Aquaculture Panel Symposium, Davis and Santa Barabara, CA.
113. Lin C K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. Pp. 13-23. In C.L. Browdy and J.S. Hopkins (ed.), swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture, 95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.
114. Lin J J. 2006. Probiotics as alternative Biomedicines for pets with digestive disorders. Proceeding of 8th Annual meeting of JBVP. 3-288-292.
115. Liu C H, Chiu C S, Lin P L, 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.
116. Lunestad B T. 1998. Impact of farmed fish on the environment, presentation by representative of Norway. In Notes of the Workshop on Aqua-culture/ Environment Interaction: impact on microbial ecology. Canadian Aquaculture Society, Halifax, Nova Scotia, Canada.
117. Madigan M, Martinko J. 2005. Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-
118. Magnadottir B. 2009. Immunological control of fish disease. Springer Science Business. Media.LLc.
119. Mahata M E. 2007. Repairing shrimp waste nutrient quality as poultry feed through chitosanase and chitinase hydrolysis from *Serratia marcescense* Food bacterium. Disertation andalas Uni, Padang, Indonesia.
120. Mahious A S, Gatesoupe F J, Hervi M, Metailler R, Ollevier F. 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). Aquaculture International. 14(3): 219-229.
121. Manush S M, Srivastava P P, Kohli, M P S, Jain K K, Ayyappan S, Metar S Y. 2013. Combined Effect of Papain and Vitamin-C Levels on Growth Performance of Freshwater Giant Prawn, *Macrobrachium rosenbergii.* Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 13: 479-486.
122. Marteau P, Seksik P, Jian R. 2002. Probiotics and intestinal health effects: clinical perspective. British Journal of Nutrition. 88: 51–57.
123. McIntosh D, Samocha T M, Jones E R, Lawrence A L, McKee D A, Horowitz S, 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.

124. Moe Y Y, Koshio S, Ishikawa M, Teshima S, Panganiban J R A, Thu M, Michae F R, Ren T. 2005. Vitamin C requirement of kuruma shrimp postlarvae, *Marsupenaeus japonicus* (Bate), using Lascorbyl-2- monophosphate-Na/Ca. Aquaculture Research. 36: 739-745.

125. Mora D, Parini C, Fortina M G, Manachini P L. 2002. Multilocus hybridization typing in *Pediococcus acidilactici* strains. Current Microbiology. 44: 77–80.

126. Nair A L, Prabhu P V, 1990. Protein concentrates from tiny prawns. Marine biological Association of India. 32 (1-2):198-200.

127. Nayak B, Kumar S, Collins P L, 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.

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

129. Nikoskelainen S, Ouwehand A C, Bylund G, Salminen S, Lilius E M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential bacteria (*Lactobacilus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology. 15: 443-452.

130. Nimrat S, Tanutpongpalin P, Sritunyalucksana K, Boonthai T, 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.

131. Nishibuchi M, Kaper J B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infection and Immunity. 63: 2093-2099.

132. Niu J, Tian L X, Liu Y J. 2009. Nutrient Values of dietary ascorbic acid (L-ascorbyl-polyphosphate) on growth, survival and stress tolerance of larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition. 1 (2): 194-201.

133. Ochoa Solano J L, Olmos Soto J. 2006. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. Food Microbiology. 23:519–525

134. Okuzumi M, Fujii T. 2000. Nutritional and functional properties of squid and cuttlefish. National Cooperative Association of Squid Processors, California. 223p.

135. Olsson J C, Westerdahl A, Conway P L, Kjelleberg S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology. 58:551-6.

136. Owens L, Haqshenas G, McElnea C, Coelen R. 1998. Putative spawner-isolated mortality virus associated with mid-crop mortality syndrome in farmed *Penaeus monodon* from northern Australia. Disease of Aquatic Organanisms. 34: 177–185.

137. Oxley A, Shipton W. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguiensis*. Journal of Applied Microbiology. 93: 214–223.

138. Padayatty S J, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S K, Levine M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of American College Nutrition. 22 (1): 18–35.

139. Panigrahi A, Kirona V, Puangkaewa J, Kobayashib T, Satoha S, Sugitac H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 243: 241–254.

140. Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J, Aoki T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. Fish and Shellfish Immunology. 31: 372-382.

141. Pelicano E R L, Souza P A, Souza H B A, Figueiredo D F, Boiago M M, Carvalho S R, Bordon V F. 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. Revista Brasileira de Ciencia Accola. 7: 221–229.

142. Peng L, Delbert M, Gatlin. 2005. Evaluation of the prebiotic GroBioticR-A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (Morone chrysops_M. saxatilis) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*, Aquaculture. 248: 197– 205.

143. Picchietti S, Mazzini M, Taddei A R, Renna R, Fausto A M, Mulero V, Carnevali O, Cresci A, Abelli L. 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. Fish and Shellfish Immunology. 22: 57-67.

144. Picchietti S, Fausto A M, Randelli E, Carnevali O, Taddei A R, Buonocore F, Scapigliati G, Abelli L. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces rise in intestinal T cells and granulocytes and modulates immune related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish and Shellfish Immunology. 26: 368-376.

145. Pillay K K, Nair N B. 1973. Observation on the biochemical changes in the gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaes affinis* during reproductive cycles. Marine Biology Journal. 18:167-198.

146. Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, Maita M. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in Veterinary Science. 91: 92–97.

147. Puga-López D, Ponce-Palafox J T, Barba-Quintero G, Torres-Herrera M R, Romero-Beltrán E, Arredondo Figueroa J L. 2013. A Comparative Study of Physico-Chemical, Proximate Composition and Microbiological Muscle Properties, in Two Species Shrimps of the Pacific Tropical Coast. Journal of Agricultural Science and Applications. 2 (3):151-154.

148. Queiroz J, Boyd C D. 1998. Effects of bacterial inoculums in channel catfish pond. Journal of World Aquaculture Society. 29: 67-73.

149. Racotta I S, Palacios E, Hernandez-Herrera R, Bonilla A, Perez-Rostro C I, Ramirez J L. 2004. Criteria for assessing larval and Postlarval quality of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Aquaculture. 233:181-195.

150. Rahiman K M M, Jesmi Y, Thomas A P, 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.

151. Rahimi E, Ameri M, Doosti A, Gholampour A R. 2010. Occurrence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in shrimp in Iran. Foodborne Pathogens and Disease. 7(9): 1107-11.

152. Ravichandran R. 2000. Biodiversity, Litter processing, Leaf preference and growth, biochemical and microbial aspects in crabs of Pichavaram mangroves. Ph.D. Thesis, Annamalai University, India.

153. Ray A J, Lewis B L, Browdy C L, Leffler J W. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant- based feed in minimal exchange, superintensive culture system. Aquaculture. 299: 89-98.

154. Reddy H R V, Shanbhogue S L. 1994. Biochemical changes in different tissues of the mantis shrimp, *Oratosq uilla neppa* (*Stomato poda*) during reproductive cycle. Indian Journal of Marine Sciences. 23:247-249.

155. Rengppat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium of black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167: 301-313.

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

157. Retno U H, Siti R. 2012. Effect of *Pediococcus Acidilactici* F-11 Addition on Antioxidant Activity and Sensory Properties of Probiotic Sweet Potato Ice Cream. Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic Acid Bacteria.

158. Ringo E, Gatesoupe F J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. Pp.160-177-203.

159. Robertson P A W, O'Down C, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium sp.* as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture. 185:235–243.

160. Rodriguez A, Le Vay L, Mourente G, Jones D A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. Marine Biology. 118: 45-51.

161. Rodrı´guez J, Le Moullac G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture. 191: 109–119.

162. Rosa R, Nunes M L. 2002. Biochemical changes in different tissues of the mantis shrimp, *Oratoasquilla nepa* (stomatopoda) during reproductive cycle. Indian Journal of Marine Sciences. Pp.247-249.

163. Rungruangsak-Torrissen K, Rustad A, Sunde J, Eiane S A, Jensen H B, Opstvedt J, Nygård E, Samuelsen T A, Mundheim H, Luzzana U. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 644-654.

164. Sahu M K, Swarnakumar N S, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. Indian Journal of Microbiology. 48:299–308.

165. Sainz Hernandez J C, Cordova Murueta J H. 2009. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 290:190-195.

166. Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, Crespo D V, Planas J, Infante C, Cañavate J, 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.

167. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenge. Antonie van Leeuwenhoek. 70: 347-358.

168. Sambhu C, Jayaprakash V. 1994. Effect of hormones on growth, Food conversion and proximate composition of the white prawn, *Penaeus indicus* (Milne Edwards). Indian Journal of Marine Sciences. 23:232-235.

169. Sapcharoen P, Rengpipat S. 2013. Effects of probiotic *Bacillus subtilis* (BP11and BS11) on the growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition. 19 (6): 946-954.

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

171. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh T R. 2001. Use of antimicrobialagents in veterinary medicine and food animal production. International Journal of Antimicrobial Agents. 17:431–437.

172. Scholz U, Garcia Diaz G, Ricque D, Cruz Suarez L E, Vargas Albores F, Latchford J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture. 176: 271-83.

173. Scura E D. 1995. Dry seasons production problems on shrimp farms in Central America and the Caribbean basin. Pp.200-213. In C.L. Browdy and J.S. Hopkins (ed.),

swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture, 95. World Aquaculture Soceity. Baton Rouge, La.

174. Senger H, Storch V, Reinecke M, Kloas W, Hanke W. 1995. A tabular overview of organogenesis in larval turbot (*Scophthamus maximus*). ICES Marine Science Symposium. 201: 35-39.

175. Servin A L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 28: 405-440.

176. Shariff M, Yusoff F M, Devaraja TN, Srinivasa Rao S P. 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) ponds. Aquaculture Research. 32:181-187.

177. Shiau S Y, Hsu T S. 1994. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with Lascorbyl- 2-monophosphate. Aquaculture. 122 (4): 347-357.

178. Silva J J, Chamul R S. 2000. Composition of marine and freshwater Finfish and shellfish species and their products. In: Maritin, R.E., E.J. Carter and L.M. Davis (Eds.), Marine and freshwater product handbook, USA: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 31-46.

179. Sissons J W. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals: A review. Journal of the Science of Food and Agriculture. 49: 1-13.

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

181. Soderhall I, Soderhall K. 2002. Immune reactions in biology of fresh water crayfish. Edited by D.M. Holdish. UK Blackwell Science. Pp. 439-464.

182. Soliman A K, Jauncey K, Roberts R T. 1987. Stability of ascorbic acid (vitamin C) and its form in fish feed during processing, storage and leaching. Aquaculture. 60: 73–83.

183. Son V M, Chang C C, Wu M C, Guu Y K, Chiu C H, 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.

184. Song Y L, Yu C I, Lien T W, Huang C. C, Lin M N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. 14:317–333.

185. Sotelo- Mundo R, Islas- Osuna A, de-la-Re-Vega E, Hrnandez- Lopez J, Vargas-Albornes F, Yepiz- Plascencia G. 2003. Cdna cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 15: 325- 331.

186. Sridhar M, Paulraj R. 2003. Efficacy of Gut Probionts in Enhancing Growth in *Penaeus indicus* post Larvae. In: Aquaculture Medicine, Centre for Fish Diseise Diagnosis and Management DVSNT, Sigh, I.S.B., S.S. Pai, R. Philip, A. Mohandas (Eds.). Kochi, India, pp. 117-122.

187. Sriket P, Benjakul S, Visessanguan W, Kijroongrojana K. 2007. Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. Food Chemistry. 103: 1199-1207.

188. Sritunyalucksana K, Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191: 53-69.

189. Sriraman K. 1978. Biological and biochemical studies on the prawns of Portonova coast (Crustacea: Decapoda: Macrura). Ph.D. Thesis, Annamalai University, India. P. 69.

190. Stanier R Y, Doudoroff M, Adelberg E A. 1963. The microbial world. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

191. Stiles M E, Holpzapfel W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology. 36: 1-29.

192. Subasinghe R. 1997. Fish health and quarantine. In Review of the State of the World Aquaculture. FAO Fisheries circular no. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy p. 45-49.

193. Sunde J, Taranger G, Rungruangsak-Torrissen K. 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Fish Physiology and Biochemistry. 25: 335-345.

194. Suzer C, Çoban D, Kamaci H O, Saka S, Firat K, Otgucuoğlu Ö. 2011. *Lactobacillus* spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata,L.*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. 280:140-5.

195. Swain S M, Singh C, Arul V. 2009. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25:697–703.

196. Tamayo R J M. 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), introduced to Cuba. International Fisheries Management, University of Tromso, Master thesis, 48pp.

197. Taoka Y, Maeda H, Jo J Y, Jeon M J, Bai S C, Lee W J, et al. 2009. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fish Science. 72:310-21.

198. Tlaskalova´-Hogenova´ H, R. Stepa´nkova´ T, Hudcovic L, Tuckova´ B, Cukrowska R, Lodinova´-Za´dnı´kova´ H, Koza´kova´ P, Rossmann J, Ba´rtova´ D, Sokol D P, Funda D, Borovska´ Z, Reha´kova´ J, Sinkora J, Hofman P, Drastich, Kokesova´ A. 2004.

Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunology Letters. 93:97–108.

199. Torrissen O, Christiansen R, Struksnæs G, Estermann R. 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. Aquaculture Nutrition. 1:77-84.

200. Tovar-Ramírez D, Zambonino I J, Cahu C, Gatesoupe F J, Vázquez-Juárez R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. Aquaculture. 234: 415–427.

201. Tseng D Y, Ho P L, Huang S Y, Cheng S C, Shiu Y L, Chiu Ch, Liu Ch H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish and Shellfish Immunology. 26: 339–344.

202. Ueberschar B. 1995. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. ICES Marine Science Symposium. 201:119–129.

203. Uma A, Abraham T J, Sundararaj V. 1999. Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. Indian Journal of Fisheries. 46(4): 367-373.

204. Utiswannakul P, Sangchai S, Rengpipat S. 2011. Enhanced growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by dietary supplementation with Bacillus (BP11) as a probiotic. Journal of Aquaculture Research and Development. S1:006.

205. Valderrama D, Engle C R. 2004. Farm-level economic effects of viral diseases on Honduran shrimp farms. Journal of Applied Aquaculture. 16: 1–26.

206. Vargas-Albores F, Gúzman M A, Ochoa J L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymp collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 106A: 299–303.

207. Vaseeharan B, Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic Vibrio spp. By *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letter in Applied Microbiology. 36: 83-7.

208. Vázquez J A, González M P, Murado M A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture. 245: 149–161.

209. Venkat H K, Sahu N P, Jain K K. 2004. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research. 35:501-7.

210. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 655–671.

211. Vieira F N, Buglione C C, Mouriño J P L, Jatobá A, Martins M L, Schleder D D, Andreatta E R, Barraco M A, Vinatea L A. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. Arquivo Brasilerio de Medicina Veterinaria e Zootecnia. 62 (3): 631-638.

212. Vine N G, Leukes W D, Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiology Reviews. 30: 404–427.

213. Walker P J, Winton J R. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. Veterinary Research. 41: 51.

214. Wang Y B, Xu Z R, Xia M S. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vanname*) ponds. Fisheries Science. 71: 1034–1039.

215. Wang Y B, Xu Z. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal feed science and technology. 127: 283-292.

216. Wang F I, 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.

217. Wang W N, Wang A L, Wang Y. 2006. Effect of supplemental L-ascorbyl-2-polyphosphate in enriched live food on the antioxidant defense system of *Penaeus vannamei* of different sizes exposed to ammonia-N. Aquaculture Nutrition. 12: 348–352.

218. Wang Y B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 269:259–264

219. Wang Y B, Tian Z, Yao J, Li W. 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture. 277: 203-207.

220. Wang Y, Fu L, Lin J. 2012. Probiotic (*Bacillus coagulans*) cells in the diet benefit the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Shellfish Research. 31(3): 1-9.

221. Witte W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. International Journal of Antimicrobial Agents. 16: S19–S24.

222. Worthington C C. 1991. Worthington manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold, New Jersey, pp.80-85.

223. Wyban J A, Sweeny J N. 1991. Intensive shrimp production technology. High health aquaculture Inc., Hawaii, 158pp.

224. Xia Z, Zhu M, 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.

225. Yanar Y, Celik M. 2006. Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckled shrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean. Food Chemistry, 94: 33-36.

226. Yang S P, Wu Z H, Jian J C, Zhang X Z. 2010. Effect of marine red yeast *Rhodosporidium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 309: 62-65.

227. Yuniarti A, Guntoro D A, Maftuch M, Hariati M A. 2013. Response of Indigenous *Bacillus megaterium* Supplementation on the Growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone), a New Target Species for Shrimp Culture in East Java of Indonesia. Journal of Basic and Applied Scientific Research. 3(1): 747-754.

228. Zhang L, Mai K, Tan B, Ai Q, Qi Ch, Xu W, Zhang W, Liufu Zh, Wang X, Ma H. 2009. Effects of Dietary Administration of Probiotic *Halomonas sp.* B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of the World Aquaculture Society. 40(1): 58-65.

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

230. Ziaei-Nejad S, Rezaei M H, Takami G A, Lovett D L, Mirvaghefi A R, Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus spp*. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. 252: 516–524.

231. Zokaeifar H, Balcázar J L, Saad Che 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: 683-689.

Comparative effect of *Pediococcus acidilactici* and *Lactococcus lactis* on growth performance, survival and enzyme activity of western white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Sara Ahmadi

Abstract

This study was done in Shahid Kiani Marine Aquaculture Development Center, Choebde, Abadan in order to evaluate the effects of *Pediiococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* and vitamin C on growth performance, survival, enzymatic activities and immune responses of *L. vannamei* during three months. Treatments were included control group, *Pediiococcus* and *Lactococcus* treatments which fed with diet containing 1×10^{9} cfu g^{-1} bacteria and vitamin C. At the end of the experiment, the growth factors, immune parameters, digestive enzymes, intestinal, histology of intestine, carcasses and microbial flora (bacterial total count and lactic acid count) were evaluated. The results indicated that administration of lactobacillus had significant effects on the growth factors as the highest weight, increase specific growth rate, relative growth rate, feed conversion ratio and protein efficiency in the shrimps received pediococcus and then Lactococcus ($P<0.05$). The best immune function was also observed in the shrimps fed by probiotics, so that proteins and hemoglobin hemolymph, phenoloxidase activity and challenged with *V. parahaemolyticus* showed a statistical difference comparing to the control group and the group received vitamin C ($P<0.05$). Some digestive enzymes, in pediococcus treatment showed a significant increase when compared to other treatments ($P<0.05$). Significant changes in bacterial intestinal flora were observed in probiotic groups compared with control and vitamin C groups ($P < 0.05$). Histological results showed the positive effects of probiotics in the gut ($P < 0.05$). While these supplements cannot caused to significant impacts on the shrimp carcass composition ($P 0.05$). As a re sult pediococcus group had the best performance among treatments.

Keywords: Probiotics, Vitamin C, growth, enzyme, immune, bacteria, *P. vannamei*.

ISLAMIC AZAD UNIVERSITY
SCIENCE AND RESEARCH BRANCH

Faculty of Natural Resources, Department of Fisheries

Ph.D Thesis of Fisheries

Subject:

Comparative effect of *Pediococcus acidilactici* and *Lactococcus lactis* on growth performance, survival and enzyme activity of western white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Thesis Advisor:

M. Soltani Ph.D
M. Shamsaie Ph.D

Consulting Advisor:

H. Rajabi Islami Ph.D
R. Peyghan Ph.D

By:

Sara Ahmadi

Summer 2014