کاربرد باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک برای افزایش پارامترهای رشد و تولید در استخرهای پرورش میگوی سفید هندی[1]

Fenneropenaeus indicus

سعید ضیایی نژاد[2] قباد آذری تاکامی[3] علیرضا میرواقفی[4] مهران حبیبی رضایی[5] مهدی شکوری[6]

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی عملکرد باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر بازده مزارع پرورش میگو انجام پذیرفت. در این مطالعه، میگوی سفید هندی(*F.indicus*) از مرحله PL_{30} تا PL_{120} در استخرهای خاکی ۱۰۰ متر مربعی در سه تیمار تحت تاثیر مخلوطی از ۵ گونه از باکتری‌های جنس باسیلوس قرار گرفت. تیمار P، شامل میگوهایی بود که فقط در مرحله پرورش پروبیوتیک دریافت می‌کردند. تیمار PP میگوهایی را در بر می‌گرفت که علاوه بر مرحله پرورش، در مرحله تکثیر نیز پروبیوتیک را دریافت کرده بودند و تیمار C به عنوان تیمار کنترل هیچ‌گونه پروبیوتیکی دریافت نمی‌کرد. بر اساس یافته‌های این تحقیق، بازماندگی، وزن تر،تولیدکل ، ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه میگوها تحت تاثیر باکتری‌های باسیلوس بویژه در تیمارPP به‌طور چشمگیری بهبود یافت ($p<0/05$).برای مثال بازماندگی، تولید کل و FCR در تیمار PP به ترتیب ٪۸۸/۵۳، $Kg/100m^2$ ۲۵/۵۶ و ۱/۷۳ و در تیمار کنترل به ترتیب ٪۷۱/۵، $Kg/100m^2$ ۱۹/۰۶ و ۱/۹۸ بود. اما از نظر طول کل و طول کاراپاس با وجود افزایش در تیمارهای پروبیوتیکی، اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل مشاهده نشد($p>0/05$).

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس، پروبیوتیک، میگوی سفید هندی، **Fenneropenaeus indicus**، رشد، بازماندگی و تولید.*

---

[1]-تاریخ دریافت: ۸۳/۴/۲۹، تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۲۴

[2]-عضو هیات علمی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه شهیدچمران اهواز و دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه تهران(E-mail: zbsaeed@yahoo.com)

[3]-استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[4]-استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[5]-استادیار بیوتکنولوژی دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[6]-کارشناس ارشد شیلات، سازمان شیلات ایران

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان فناوری جدید آبزی‌پروری همگام با محیط زیست مطرح شده است. تعریف جدید این ترکیبات را که کاملاً در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها یا مواد پاد زیست قرار می‌گیرند، فولر[1] (۱۹۸۹) ارائه کرد که بر ماهیت زنده پروبیوتیک‌ها تاکید دارد. مطابق این تعریف، پروبیوتیک یک مکمل غذایی میکربی زنده است که از طریق بهبود بالانس میکربی روده تاثیرات سودمندی بر روی میزبان دارد.

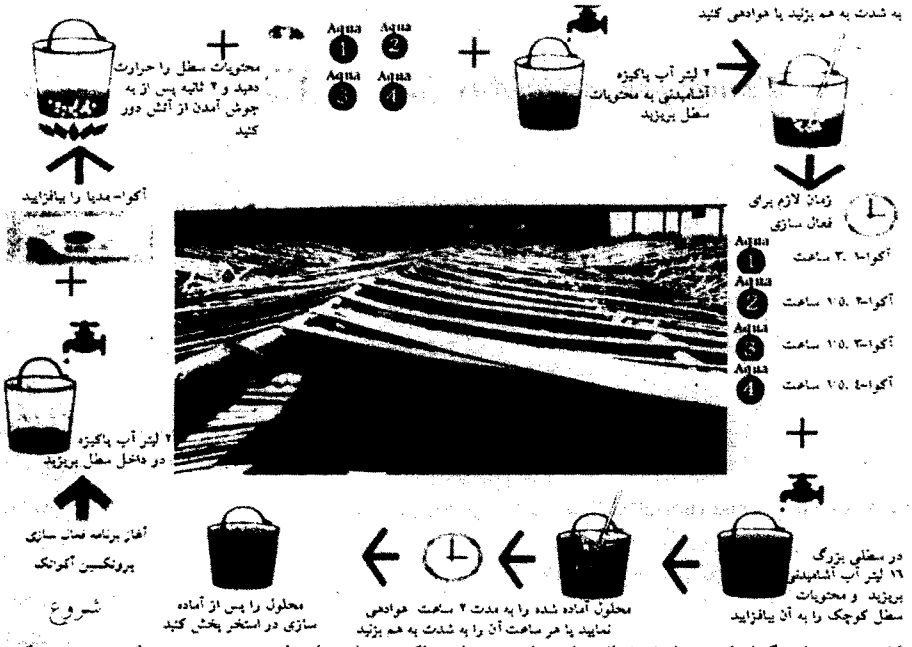
تحقیقات گوناگون نشان داده که با استفاده از این مواد، هم می‌توان تولید را افزایش داد و هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم اینکه می‌توان آنها را به عنوان مبارزه بیولوژیک مدنظر قرار داد (۱۴). در این مورد و با توجه به موفقیت‌های اخیر این روش نوین آبزی‌پروری، سازمان خواربار جهانی (FAO)، استفاده از پروبیوتیک‌ها را به عنوان موارد عمده تحقیقات آینده در آبزی‌پروری تعیین کرده است (۱۲). نتایج این تحقیقات بدون تردید به افزایش تولید و کاهش استفاده از مواد شیمیایی و داروها در آبزی‌پروری کمک خواهد کرد و تولیدات با کیفیت مناسب‌تری را از نظر سلامت تغذیه‌ای برای مصرف‌کنندگان ارایه خواهد داد. در کشور ما نیز با توجه به گسترش صنعت پرورش میگو و مشکلاتی که اخیرا گریبان‌گیر این صنعت شده، به‌نظر می‌رسد به‌کارگیری این مواد بتواند تولید را در واحد سطح افزایش دهد و همچنین با کنترل مشکلات و مسائل موجود در این صنعت از جمله مسئله کنترل عوامل بیماریزا، دورنمای روشن‌تری را برای صنعت پرورش میگوی ایران ترسیم کرده و پرورش‌دهندگان را به ادامه این فعالیت تولیدی اشتغال‌زا ترغیب کرد.

لذا این تحقیق به منظور بررسی کارایی پروبیوتیک‌های تجاری در شرایط کشور ما بر روی گونه بومی ایران یعنی میگوی سفید هندی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

۱-نوع پروبیوتیک مصرفی

در این تحقیق از یک پروبیوتیک تجاری حاوی اسپورهای ۵ گونه از باکتری‌های جنس باسیلوس شامل *Bacillus subtilis*، *B. licheniformis*، *B. polymyxa*، *B. laterosporus* و *B. circulans* استفاده شد. این پروبیوتیک به صورت مایع بوده و در کل حاوی Cfu/ml 1×10^{10} اسپور باکتری باسیلوس است. فعال‌سازی این اسپورها بر اساس شیوه توصیه شده توسط شرکت سازنده (پروتکسین آکواتک، پرونده ثبت،۲۰۰۳) و بر اساس شمای گرافیکی شکل (۱) با کمک شوک حرارتی صورت پذیرفت (۱).



شکل ۱- شمای گرافیکی مراحل فعال‌سازی اسپورهای باکتری‌های باسیلوس موجود در این پروبیوتیک

۱-Fuller

۲-طرح آزمایش

مطالعه حاضر که در کارگاه آموزش و بازسازی ذخایر آبزیان بندر کلاهی بر روی میگوی سفید هندی *F. indicus* در ۹ استخر خاکی ۱۰۰ متر مربعی انجام پذیرفت، شامل ۳ تیمار با ۳ تکرار بود. تیمار اول، شامل میگوهایی بود که در مرحله تکثیر(از ناپلی ۱ تا پست لارو مرحله ۳۰) این پروبیوتیک را دریافت کرده بودند و در مرحله پرورش(از پست لارو مرحله ۳۰ تا ۱۲۰) نیز از طریق آب در معرض این پروبیوتیک قرار می‌گرفتند (تیمار PP). تیمار دوم، شامل میگوهایی بود که در مرحله تکثیر هیچ‌گونه پروبیوتیکی دریافت نکرده بودند و فقط در مرحله پرورش(از پست لارو مرحله ۳۰ تا ۱۲۰) این پروبیوتیک را از طریق آب دریافت می‌کردند (تیمار P)، و تیمار سوم (تیمار کنترل)، شامل میگوهایی بود که نه در مرحله تکثیر و نه در مرحله پرورش هیچ‌گونه پروبیوتیکی دریافت نمی‌کردند (تیمار C).

تراکم ذخیره‌سازی ۲۰۰۰ قطعه میگو در هر استخر (۲۰ قطعه در متر مربع) بود (میگوها در زمان ذخیره‌سازی در مرحله $PL_{۳۰}$ بودند). قبل از ذخیره‌سازی، مراحل آماده‌سازی استخرها شامل تعمیر دیواره و دریچه‌ها، برداشت لجن کف، شست‌وشو و آهک‌پاشی انجام گرفت. طی این تحقیق که به مدت ۹۰ روز (تا مرحله $PL_{۱۲۰}$) ادامه یافت، تغذیه میگوها با استفاده از غذای کنسانتره میگو (شرکت هووراش) به میزان ۱۱درصد وزن تر بدن در اوایل دوره تا ۵درصد در انتهای دوره به‌طور یکسان در هر سه تیمار انجام می‌گرفت. تعویض آب نیز روزانه ۱۰درصد صورت می‌پذیرفت. شایان ذکر است که در این تحقیق از پست لاروهای حاصل از مولدین پرورشی با وزن متوسط ۴۰ گرم استفاده شد.

افزودن پروبیوتیک بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده(پروتکسین آکواتک ، پرونده ثبت،۲۰۰۳) یک روز قبل از ذخیره‌سازی (پس از آبگیری استخرها) و در طی دوره به‌طور هفتگی به میزان ۱/۲ میلی لیتر برای تمام استخرهای پروبیوتیکی (۶ استخر) صورت می‌پذیرفت. افزودن این پروبیوتیک به تیمارهای P و PP کاملاً یکسان بود و در یک زمان به آب استخرها افزوده می‌شد.

۳- عوامل مورد بررسی

شاخص‌های رشد، بازماندگی و عوامل تغذیه‌ای به‌طور مرتب و با فواصل هر ۳-۲ هفته یک‌بار، ۳۰-۲۰ قطعه میگو به‌طور تصادفی از هر استخر صید گردیده و وزن‌تر، طول کل و طول کاراپاس آنها سنجیده شد. بازماندگی نیز به صورت درصد و بر اساس تعداد میگوهای زنده‌مانده در پایان هر آزمایش برآورد شد.

ضریب تبدیل غذایی[۱] (FCR) و ضریب رشد ویژه[۲] (SGR) در این تحقیق بر اساس فرمول‌های زیر مورد بررسی قرار گرفت.

$$FCR=\frac{\text{وزن خشک غذای خورده شده (Kg)}}{\text{وزن تر میگو با تولید (kg)}}$$ فرمول (۱)

$$SGR=\frac{(Lnw_{۱}-Lnw_{0})\times ۱۰۰}{t}$$ فرمول (۲)

که در این فرمول Lnw_0 لگاریتم طبیعی وزن اولیه و Lnw_1 لگاریتم طبیعی وزن ثانویه و t تعداد روز پرورش است.

شمارش تعداد باکتری‌ها

به این منظور هر ۲-۱ هفته یک‌بار نمونه‌برداری از آب استخر ها و نیز میگوها در ظروف شیشه‌ای استریل انجام می‌گرفت. نمونه‌ها از نظر پارامترهای باکتریایی شامل تعداد کل باکتری‌ها[۳] و نیز تعداد باسیلوس‌ها بر حسب cfu/ml (در نمونه‌های آب) و cfu/g(در نمونه‌های میگو) مورد سنجش قرار می‌گرفتند.

نمونه‌های میگو پس از انتقال به آزمایشگاه با چاقوی جراحی استریل کالبدگشایی شده و لوله گوارش آنها خارج می‌شد. سپس لوله گوارش به‌وسیله هموژن‌کننده شیشه‌ای

۱- Food Conversion Rate(FCR)

۲-Specific Growth Rate(SGR)

۳-Total count

و با افزودن تدریجی ۹ برابر(w/v)محلول نمکی نرمال استریل (۰/۸۷Nacl w/v درصد) کاملاً له و هموژن شدند. نمونه‌های آب نیز نخست به‌شدت تکان داده می‌شدند تا یکنواخت شوند، سپس به‌طور سریالی با محلول نمکی نرمال رقیق می‌شدند. رقیق‌سازی هم در نمونه‌های آب و هم در مورد میگوها به‌طور سریالی تا ۱۰ بار صورت می‌پذیرفت.

تعداد کل باکتری‌ها بر اساس روش رنگپیپات و همکاران[۱] (۱۹۹۸) و شریف و همکاران (۲۰۰۱) بر روی محیط‌های Nutrient agar (با یک درصد NaCl, w/v) و Tryptic soy agar (با یک درصدNaCl, w/v) شمارش شد. برای شمارش تعداد باسیلوس‌های پروبیوتیک براساس روش توصیه‌شده توسط شرکت Probiotics International Ltd (پروتکسین، آکواتک، پرونده ثبت،۲۰۰۳)با استفاده از پلت‌های استاندارد آگار (Standard methods agar plates, SMA)و محیط‌های کشت(*Bacillus cereus* agar (oxiod CM617و Yeast extract agar عمل می‌شد.

پلت‌ها ۷۲ ساعت در $۳۷^{\circ}c$ قرار داده شدند. در مورد نمونه‌های آب از دمای $۲۵^{\circ}c$ به مدت ۶۸ ساعت استفاده می‌شد. پس از این مدت، کلونی‌ها شمارش شده و تعدادی از آنها نیز از طریق رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی دوباره مورد بررسی دقیق قرار می‌گرفتند.

۴- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این تحقیق در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی[۲] در سه آزمایش مجزا انجام گرفت. نرمال بودن کلیه داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار MINITAB ۱۳/۳۱ در آزمون Anderson-Darling در سطح ۹۵درصد بررسی شد، سپس میانگین کلیه داده‌های هر سه آزمایش به‌طور جداگانه با استفاده از آزمون مقایسه چنددامنه دانکن[۳] در سطح ۹۵درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS[۴] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

رشد، بازماندگی و عوامل تغذیه‌ای

الف – بازماندگی

یافته‌های این تحقیق نشان داد که افزودن این پروبیوتیک تأثیر قابل توجهی در افزایش درصد بازماندگی میگوی سفید هندی دارد(جدول ۱). در این تحقیق، تیمار PP(تیماری که هم در مرحله تکثیر و هم در مرحله پرورش در معرض پروبیوتیک قرار داشتند) با میانگین بازماندگی ۸۸/۵۳درصد بیشترین بازماندگی را داشت که دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (۷۱/۵درصد) بود ($\rho < ۰/۰۵$) اما با تیمارP (۸۲/۲۵درصد) یعنی تیماری که فقط در مرحله پرورش پروبیوتیک را دریافت کرده بود، تفاوت معنی‌داری نداشت($\rho > ۰/۰۵$).

ب- طول کل و طول کاراپاس

هر چند تیمارهای P، PP به ترتیب با میانگین طول کل ۱۳/۴۷ و ۱۲/۳۶ سانتی‌متر طول بیشتری نسبت به تیمار کنترل (۱۲/۱۷ سانتی متر) داشتند، اما اختلاف تیمارها معنی‌دار نبود ($\rho > ۰/۰۵$) (جدول ۱). همان‌گونه که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، بیشترین میانگین طول کاراپاس نیز در تیمار PP مشاهده شد (۲/۶۳ سانتی‌متر)که تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها نداشت($\rho > ۰/۰۵$).

ج- وزن تر

تیمارPP با میانگین وزن تر ۱۴/۳۱ گرم اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل (۱۲/۲۶ گرم) داشت ($\rho < ۰/۰۵$)، اما با تیمار P (۱۳/۲۲ گرم) تفاوت زیادی نشان نداد($\rho > ۰/۰۵$) (جدول ۱).

د- تولید کل

بیشترین تولید با میانگین ۲۵/۵۶ کیلوگرم در تیمارPP مشاهده شد که این میزان در مقایسه با میانگین تولید در تیمار شاهد (۱۹/۰۶ کیلوگرم) دارای اختلاف معنی‌داری

۱-Rengpipat & *et al.*

۲- Completely Randomized Block Design

۳- Duncan multiple range test

۴- Statistical Analysis Software

جدول۱- میانگین عوامل رشد و بازماندگی و نیز عوامل تغذیه‌ای در تیمارهای مختلف

تیمار	بازماندگی (٪)	وزن تر (g)	طول کل (cm)	طول کاراپاس (cm)	تولید کل (kg/100m^2)	FCR	SGR (٪)
P	۸۲/۲۵^{ab}	۱۳/۲۲^{ab}	۱۲/۳۶^{a}	۲/۵۸^{a}	۲۲/۰۶^{ab}	۱/۸۷^{ab}	۵/۹۳^{ab}
PP	۸۸/۵۳^{a}	۱۴/۳۱^{a}	۱۳/۴۷^{a}	۲/۶۳^{a}	۲۵/۵۶^{a}	۱/۷۳^{a}	۶/۰۲^{a}
C	۷۱/۵^{b}	۱۲/۲۶^{b}	۱۲/۱۷^{a}	۲/۴۶^{a}	۱۹/۰۶^{b}	۱/۹۸^{b}	۵/۸۵^{b}

- حروف لاتین مشابه در بالای اعداد نشانه معنی‌دار نبودن پارامتر مورد بررسی است ($\rho > ۰/۰۵$).

بود ($\rho < ۰/۰۵$)، اما با تیمارP(۲۲/۰۶) تفاوت قابل توجهی نداشت($\rho > ۰/۰۵$) (جدول ۱).

ه – ضریب تبدیل غذایی

داده‌های این تحقیق نشان داد که افزودن باسیلوس‌های پروبیوتیکی به محیط پرورش میگوها بویژه وقتی در مرحله هچری نیز این پروبیوتیک را دریافت کرده باشند، تاثیر زیادی در کاهش ضریب تبدیل غذایی خواهد داشت. کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی در تیمارPP مشاهده شد که برابر ۱/۷۳ بود. از نظر آماری بین این تیمار و تیمار شاهد (۱/۹۸) اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($\rho > ۰/۰۵$)، اما بین تیمار PP و تیمارP (۱/۸۷) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($\rho > ۰/۰۵$) (جدول ۱).

خ- ضریب رشد ویژه

نتایج این مطالعه نشان داد که ضریب رشد ویژه نیز تحت تأثیر پروبیوتیک قرار دارد. بیشترین ضریب رشد در تیمار PP به‌دست آمد که رشد روزانه‌ای برابر ۶/۰۲ درصد را نشان می‌دهد. از نظر این پارامتر بین تیمار PP و تیمار شاهد (۵/۸۵٪) تفاوت معنی‌داری وجود داشت($\rho < ۰/۰۵$)، اما تفاوت تیمار PP با تیمار P(۵/۹۳) معنی‌دار نبود ($\rho > ۰/۰۵$) (جدول ۱).

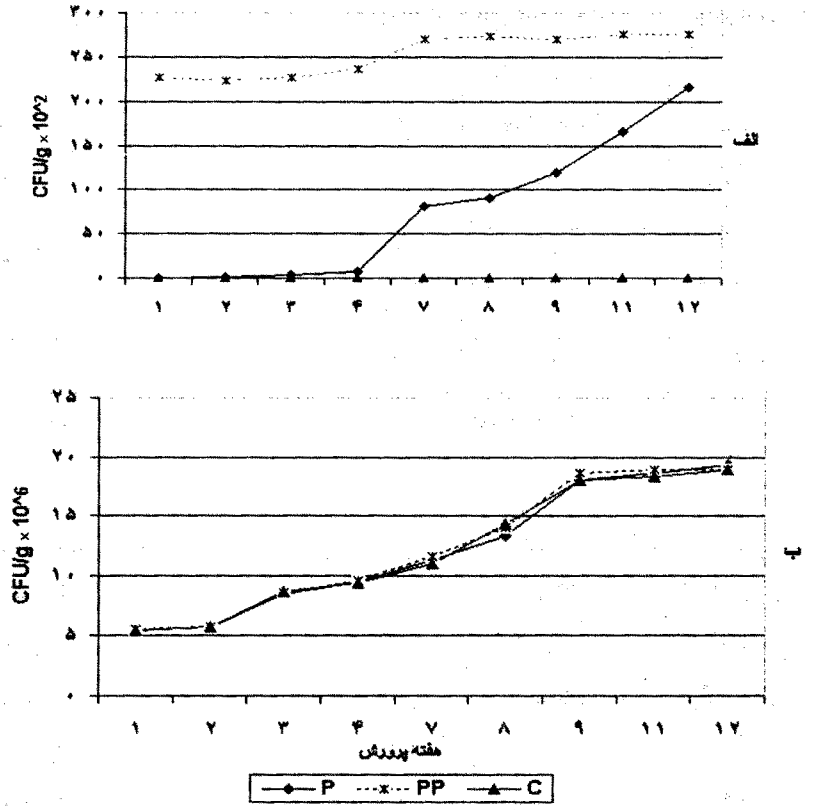
۲- آزمایش‌های باکتریایی

در مرحله پرورش همان‌گونه‌که در شکل (۲) نیز مشاهده می‌شود، تعداد باسیلوس‌ها در دستگاه گوارش میگوهای تیمار PP در طی آزمایش با حفظ میزان اولیه خود تقریباً ثابت مانده است که نشان‌دهنده کلونی‌سازی مناسب و ثابت دستگاه گوارش آنها در مرحله تکثیر توسط این باکتری‌ها است. اما در تیمارP با روندی کند تعداد باسیلوس‌ها در دستگاه گوارش میگوها افزایش یافت، اما هرگز به تیمار PP نرسید.

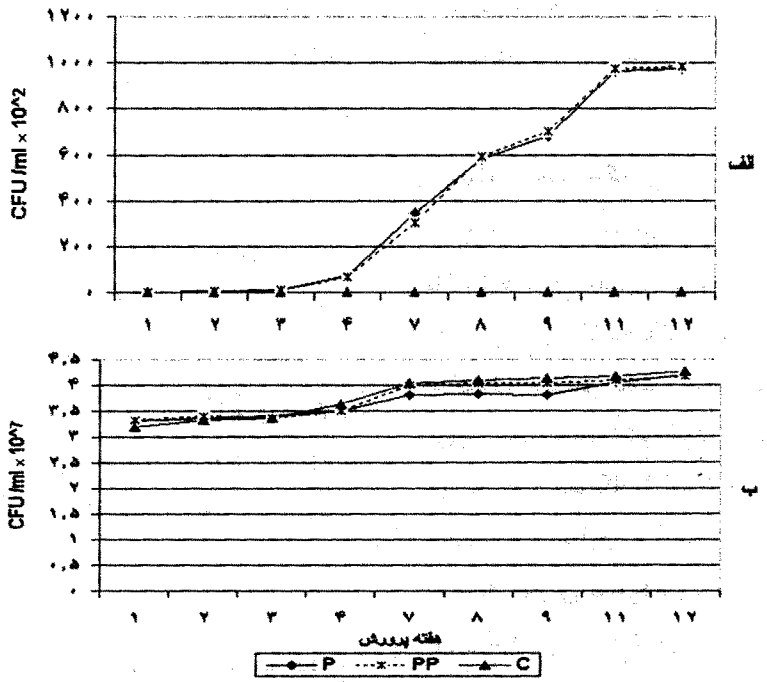
با مراجعه به شکل (۳)، می‌توان دریافت که روند افزایش باکتری‌های باسیلوس در آب استخرهای پرورشی در هر دو تیمار PP ، P یکسان بوده و در هر دو بسیار به کندی صورت پذیرفت و تقریباً پس از هفته چهارم شاهد افزایش باسیلوس‌ها در آب استخرها می باشیم.

بحث و نتیجه‌گیری

آنچنان‌که از نتایج این آزمایش برمی‌آید (شکل‌های ۲و۳)، باکتری‌های باسیلوس موجود در این پروبیوتیک توانسته‌اند به خوبی فلور غالب باکتری‌های محیط(آب) و لوله گوارش میگوها را تشکیل دهند. در واقع، شرط لازم برای اینکه یک پروبیوتیک بتواند تاثیر خود را اعمال کند نیز همین استقرار در محیط و دستگاه گوارش است. در این مرحله همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده شد تعداد باکتری‌های باسیلوس در لوله گوارش میگوهای تیمار PP که در دوره هچری نیز پروبیوتیک را دریافت کرده بودند، در مرحله پرورش تقریباً ثابت مانده است که بر استقرار دائمی و پایدار این باکتری‌ها در لوله گوارش دلالت دارد. اما در تیمار P که تنها در



شکل۲- نمودار تعداد باسیلوس‌ها (الف) و تعدادکل باکتری‌های(ب) موجود در دستگاه گوارش میگو در تیمارهای مختلف



شکل ۳- نمودار تعداد باسیلوس‌ها(الف) و تعداد کل باکتری‌های(ب) موجود در آب در تیمارهای مختلف

مرحله پرورش این پروبیوتیک را دریافت کرده‌بودند، افزایش این باکتری‌ها در لوله گوارش به کندی انجام گرفت و در نهایت به $۲/۱۶\times۱۰^{۴}$ cfu/g رسید که دقیقاً مشخص نیست چه تعداد از آنها با اتصال به موکوس روده در دستگاه گوارش مستقر شده و چه تعداد به صورت گذرا در دستگاه گوارش وجود داشته و شمارش شده‌اند. بنابراین افزودن پروبیوتیک بلافاصله پس از تخم‌گشایی به‌منظور اشغال و کلونی‌سازی لوله گوارش بسیار حائز اهمیت است.

فولر (۱۹۹۲) با بیان این مطلب که فلور دستگاه گوارش در مرحله نوزادی هنوز در حال تغییر است، عنوان کرده که این اصل کلی همواره حاکم است که تأثیرگذاری بر فلور دستگاه گوارش در طول این دوره در مقایسه با مراحل بعدی زندگی آسان‌تر است. به این دلیل که بعدها فلور نسبتاً ثابتی در لوله گوارش ایجاد می‌شود. بنابراین می‌توان توصیه کرد که مصرف پروبیوتیک‌ها باید تا حد ممکن مدت کوتاهی پس از تخم‌گشایی و شروع تغذیه آغاز شود.

رینگو و وادستین[۱] (۱۹۹۸) نیز با اشاره به اهمیت تجویز پروبیوتیک‌ها در زمان تغذیه اولیه در مورد لاروهای ماهی، بیان کرده‌اند که خوردن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بویژه پس از تغذیه اولیه در مرحله کیسه زرده موجب استقرار یک فلور میکربی اولیه در روده آنها می شود. این فلور میکربی با توالی ادامه می یابد تا زمانی‌که جانور بالغ شود و فلور میکربی دستگاه گوارش استقرار یابد که تقریباً یک فلور میکربی ثابت است. از این‌رو با مصرف پروبیوتیک‌ها در مرحله نوزادی، میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی می‌توانند بخش زیادی از فلور میکربی ثابت دوران بلوغ را به خود اختصاص دهند.

از نظر بازماندگی، همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده شد، این پروبیوتیک تأثیر قابل توجهی بر بازماندگی میگوها در مراحل مختلف رشد داشته است.

شاید بتوان یکی از دلایل افزایش بازماندگی را از بین رفتن سایر باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های مضر توسط باکتری‌های باسیلوس و یا رقابت این باکتری‌ها با سایر باکتری‌ها و در نهایت تشکیل فلور غالب باکتریایی دانست.

همانگونه که موریارتی (۱۹۹۸) نیز بیان می‌کند باکتری‌های باسیلوس هم قادرند سایر باکتری‌ها را از بین ببرند (با تولید آنتی بیوتیک‌ها) و هم قادرند برای مواد غذایی، فضا و سطح با سایر باکتری‌ها رقابت کنند.

رنگپیپات و همکاران (۱۹۹۸) نیز نشان دادند که پروبیوتیک *Bacillus S* ۱۱ قادر است هم در محیط و هم در دستگاه گوارش میگو و هم در مدفوع میگو جایگزین گونه‌های ویبریو شود و از این طریق بازماندگی را افزایش دهد. به علاوه این مسئله (افزایش بازماندگی) ممکن است به علت افزایش سطح ایمنی میگو و مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا نیز باشد.

رنگپیپات و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشته‌اند که پروبیوتیک *Bacillus S* ۱۱ می‌تواند با فعال‌سازی دفاع ایمنی هومورال[۲] و سلولی[۳] و نیز با مکانیسم حذف رقابتی[۴] در دستگاه گوارش میگو، از آنها در برابر بیماری‌ها محافظت کند و بازماندگی را بهبود بخشد. همچنین در توجیه افزایش پاسخ‌های ایمنی بیان کرده‌اند که آنتی‌ژن‌های سطح *Bacillus S*۱۱ یا متابولیت‌های آنها ممکن است برای دفاع ایمنی میگوها به عنوان ژنهای ایمنی[۵] عمل کنند.

همچنین ایتامی و همکاران (۱۹۹۸) بیان داشته‌اند که پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی *Bacillus S*۱۱ ممکن است با اثر بر روی گرانولوسیت‌ها برای فعالیت بیگانه‌خواری بیشتر، سبب عملکرد دفاعی در میگوها شوند.

به‌علاوه سلول‌های مرده *Bacillus S*۱۱ و اسپورهایشان ممکن است به عنوان یک باکترین[۶] عمل کند که در واقع واکسنی تهیه‌شده از سلول‌های مرده باکتریایی است که به عنوان یک پروفیلاکسیس[۷] (پیشگیری از بیماری) و پروبیوتیک فعالیت دارد (۱۳). لذا مشاهده می‌شود که پروبیوتیک‌ها به‌ویژه باسیلوس‌ها به روش‌های

۱-Ringo & Vadstein

۲-Humoral Immune Defenses
۳-Cellular Immune Defenses
۴-Competitve Exclusion
۵-Immunogen
۶-Bacterin
۷-Prophylaxis

زیادی می‌توانند باعث افزایش بازماندگی در آبزیان شوند. با وجود این، شریف و همکاران (۲۰۰۱) بیان کرده‌اند که هر چند بازماندگی میگوی *Penaeus monodon* تیمار شده با پروبیوتیکی تجاری (که یکی از اجزای آن گونه‌های باسیلوس است) بیشتر از تیمار کنترل بوده، ولی این اختلاف معنی‌دار نبوده است($p>۰/۰۵$). به علاوه مکینتاش و همکاران[۱] (۲۰۰۰) نیز گزارش دادند که افزودن پروبیوتیکی که حاوی مخلوطی از گونه‌های باسیلوس است تأثیر معنی‌داری بر بازماندگی، وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی میگوی *Litopenaeus vannamei* ندارد ($p>۰/۰۵$). آنها بیان داشته‌اند که دلیل معنی‌دار نبودن این تفاوت‌ها این است که فلور میکربی طبیعی موجود در محیط میگوها برای حفظ کیفیت آب در حد مناسب و تقویت رشد و بازماندگی آنها کافی بوده است.

از نظر عوامل رشد، از جمله طول کل، طول کاراپاس و وزن تر، افزایش‌هایی در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به تیمار کنترل رخ داد. به‌نظر می‌رسد تنها عاملی که می تواند دلیل این افزایش رشد باشد، افزایش فعالیت ویژه آنزیم‌های گوارشی در محوطه لوله گوارش میگوها بوده که سبب هضم و جذب بهتر غذا و افزایش کارایی تغذیه ای میگوها شده است.

در واقع به نظر می‌رسد همان‌گونه‌که ضیایی‌نژاد (۱۳۸۲) نشان داد، باکتری‌های باسیلوس موجود در این پروبیوتیک با افزایش فعالیت سه آنزیم گوارشی شاخص لیپاز، آمیلاز و پروتئاز و ترشح این آنزیم‌ها به محوطه لوله گوارش میگوها سبب افزایش قابلیت هضم[۲] و جذب غذا و در نتیجه افزایش کارایی تغذیه‌ای[۳] شده‌اند. همان‌گونه‌که از نتایج این آزمایش کاملاً مشخص است، افزایش قابلیت هضم و جذب غذا موجب افزایش عوامل رشد و ضریب رشد ویژه (SGR) در تیمارهای پروبیوتیکی شده است. ازطرف دیگر، این عامل به افزایش کارایی تغذیه ای و در نتیجه کاهش ضریب تبدیل غذایی (FCR) منجر می‌گردد که نتایج این تحقیق نیز کاملاً مؤید آن است.

همان‌گونه که از این تحقیق می توان نتیجه گرفت، پروبیوتیک‌ها دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای حل مشکلات کنونی پرورش میگو در کشور ما می‌باشند و می‌توانند از بسیاری از مشکلات جلوگیری کنند. به عنوان مثال افزایش تولید در حدود ۰/۵ تن در هکتار که در این آزمایش به‌دست آمد، می‌تواند از نظر اقتصادی بویژه در شرایط کنونی که پرورش‌دهندگان میگو در ایران با مسائل اقتصادی مواجه‌اند، بسیار مثمر ثمر باشد. اما از سوی دیگر، مسائل زیست‌محیطی و خطرهای احتمالی ورود سویه‌های میکربی جدید را نباید از ذهن دور داشت و هر چند سویه‌هایی که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، جزء باکتری‌های بی‌خطر (باکتریهای GRAS[۴]) بوده و آزمایش‌های متعددی را به‌ویژه از جنبه بیماری‌زایی(هم بر روی موجود هدف و هم بر روی سایر موجودات احتمالی آن اکوسیستم آبزی‌پروری) پشت سر می‌گذارند تا به عنوان یک پروبیوتیک تجاری جواز ورود به بازار را بگیرند، با وجود این انجام مطالعات بیماری‌شناختی در شرایط کشور ما در زمینه مطالعه حاضر می‌تواند کلیه زوایای استفاده از پروبیوتیک‌ها را روشن سازد تا بتوانیم بدون نگرانی از مسائل زیست‌محیطی این مواد را در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار دهیم.

۱- McIntosh & *et al.*
۲- Digestibility
۳- Feed efficiency
۴- Generally Recognized As Safe (GRAS)

منابع

۱- ضیایی‌نژاد، سعید.۱۳۸۲. بررسی تاثیر باکتری‌های باسیلوس (*Bacillus spp*) به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیم‌های گوارشی مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*)، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، به راهنمایی دکتر قباد آذری تاکامی.

2-Fuller, R., 1989. Probiotics in Man and Animal. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.

3-Fuller, R., 1992. History and Development of Probiotics. In: Fuller, R.(Ed.) , Probiotics: the Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, pp. 1–8.

4-Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., & Takahashi, Y., 1998. Enhancement of Disease Resistance of Kuruma Shrimp, *Penaeus japonicus*, After Oral Administration of Peptidoglycan Derived From *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164,277-288

5-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

6-Moriarty, D.J.W., 1998. Control of Luminous *Vibrio* Species in Penaeid Aquaculture Ponds. Aquaculture 164,351–358.

7-Protexin aquatech., 2003, Registration Dossier.Probiotics International Ltd.42 page.

8-Rengpipat, S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S.,& Menasveta P.. 1998. Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. Aquaculture 167:301–313.

9-Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasaveta, P., 2000. Immunity Enhancement on Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by a Probiont Bacterium (*Bacillus S11*). Aquaculture 191,271-288.

10-Ringo E., & Vadstein, O., 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in Early Developing Turbot, *Scophtalmus maximus*(L.) Larvae. J. Appl. Microbial. 84, 227–233.

11-Shariff ,M., Yusoff ,F.M., Devaraja ,T.N., & 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

12-Subasinghe, R. 1997. Fish Health and Quarantaine, p. 45-49. In Review of the State of the World Aquaculture - FAO Fisheries Circular No. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

13-Sung, H.H., Song. Y.L., & Kou, G.H., 1991. Potential Uses of Bacterium to Prevent Shrimp Vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 1, 311-312

14-Verschuere, L., Rombaut, G. Sorgeloos, P. Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbial. Mol. Biol. Rev. 64, 655-671.

Application of *Bacillus* spp. Bacteria as a Probiotic for Enhancement of Growth and Production Parameters in Indian White Shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) Ponds

S. Ziaei nejad[1] Gh. Azari Takami[2] A.R. Mirvaghefi[3] M. Habibi Rezaei[4] M. Shakouri[5]

Abstract

This investigation was performed with the aim of surveying the effect of *Bacillus* bacteria administration, as a probiotic, on shrimp farms production efficiency. Indian white shrimp (*F.indicus*) was affected by a mixture of 5 species of *Bacillus* bacteria from PL_{30} to PL_{120} in 100 m^2 earthen-ponds in three treatments: Treatment P consisted of shrimp that received the probiotic only in farming stage (PL_{30} to PL_{120}); treatment PP was consistent of shrimp that received the probiotic in both hatchery ($nauplii_1$ to PL_{30}) and farming stages, and finally control (C) that received no probiotic in either of the hatchery or farming stages. According to findings in the investigation shrimp survival rate, wet weight, final production, FCR and SGR improved significantly ($\rho<0.05$) with application of *Bacillus* bacteria, specially in treatment PP. To cite an example; survival rate, final production and FCR were 88.53%, 25.56 Kg/100m^2, and 1.73 respectively in treatment PP while 71.5%, 19.06 Kg/100m^2 and 1.98 in control. However from total and carapace length points of view there were no significant differences observed among treatments ($\rho>0.05$).

Keywords: *Bacillus* spp., Probiotic, Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Growth, Survival, Production

[1] *-Scientific Staff Member, Faculty of Natural Resources, Shahid Chamran University. and Ph.D. Scholar in Fisheries, University of Tehran (E-mail: Zbsaeed@yahoo.com)*
[2] *-Professor, Faculty of Veterinary, University of Tehran*
[3] *--Assistant Professor Faculty of Natural Resources, University of Tehran*
[4] *-Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Tehran*
[5] *-Senior Expert, Iran Fisheries Organization*