شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۲۰۴-۱۹۳

بررسی تلقیح مخلوط‌های سوسپانسیون باکتریایی لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و باسیلوس (*Bacillus*) تلقیح شده به آب سیستم پرورشی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) و مطالعه‌ی شاخص‌های رشد و نرخ بقای آنها

مصطفی علی‌شیری جونقانی[۱]، کامران رضایی توابع[۲]، غلامرضا رفیعی[۳]، بهمن جمشیدی[۴*]

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۴. دانش آموخته کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

چکیده

تقویت مکانیسم‌های دفاعی با مواد تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی مانند پروبیوتیک‌ها راهکار مناسبی برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها، افزایش کارایی تکثیر و پرورش در آبزیان و سبب بهبود فاکتورهای ایمنی در آبزی پروری می‌شود می‌باشد. در این پژوهش اثرات ترکیبی و متقابل غلظت‌های بهینه دو پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس بر شاخص‌های کیفی شامل: شاخص مرحله لاروی، شاخص وضعیت لاروی، وزن خشک لارو، درصد بازماندگی لارو، همزمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو، زمان پیدایش اولین پست‌لارو، طول دوره لاروی و تست‌های استرس شوری و فرمالین با هدف بررسی تاثیرپذیری شاخص‌های کیفی رشد و ایمنی لارو میگو وانامی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بر اساس مطالعات گذشته دو غلظت CFU/g ۳×۱۰^{۵} (B_1) و ۶×۱۰^{۵} (B_2) از مخلوط باکتریایی پروبیوتیک باسیلوس و دو غلظت CFU/g ۳×۱۰^{۶} (L_1) و ۶×۱۰^{۶} (L_2) از مخلوط باکتریایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس با یکدیگر ترکیب و به صورت مخلوط سوسپانسیونی شامل: B_1L_1 ، B_1L_2، B_2L_1 و B_2L_2 به آب مخازن لاروی میگوی وانامی اضافه شد. نتایج پژوهش نشان داد که شاخص‌های کیفی لاروی در مخلوط‌های باکتریایی سطوح مختلف پروبیوتیک ترکیبی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت و بهترین نتایج در مخلوط باکتریایی ۴ و به ترتیب: بازماندگی ۶۱±۳/۴۱ درصد، وزن خشک mg ۱۴۳±۵/۴۸، همزمانی رسیدن لارو به پست‌لارو ۱/۲۶±۰/۰۲، زمان پیدایش اولین پست لارو ۷/۵±۰/۸۲ روز، طول دوره لاروی ۸/۴±۰/۱۵ روز بود. دو شاخص مرحله لاروی و شاخص وضعیت لاروی در روز سوم، ششم و نهم بررسی شدند که نتایج حاکی از اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و سایر تیمارهای ترکیبی، و عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ترکیبی برای هر دو شاخص بود. همچنین آزمون‌های استرس شوری و فرمالین نیز حاکی از تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل با مخلوط‌های باکتریایی مختلف پروبیوتیک ترکیبی برای همه‌ی شاخص‌ها می‌باشند. در نهایت از مهم‌ترین شاخص‌های کیفی لارو ۳۱ درصد افزایش بقا، ۳۰ درصد افزایش وزن خشک، ۳۳/۸ درصد بهبود شاخص همزمانی رسیدن لارو به پست‌لارو، ۱۴/۷ درصدکاهش زمان پیدایش اولین پست‌لارو و ۲۰درصد کاهش طول دوره لاروی در مخلوط باکتریایی ۴ مشاهده شد، که می‌توان نتیجه گرفت استفاده ترکیبی از این سوسپانسیون پروبیوتیکی تاثیر قابل توجهی در شاخص‌های کیفی لاروها داشته‌است.

واژگان کلیدی: باسیلوس، لاکتوباسیلوس، میگو پاسفید غربی، شاخص LCI و LSI

* نویسنده مسئول: کامران رضایی توابع
Email: krtavabe@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 2, Summer 2022
pp. 193-204

Study of the inoculation blends of *Lactobacillus* and *Bacillus* bacterial suspension mixtures inoculated into water of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and study of growth parameters and survival rate

Mostafa Alishiri[1], Kamran Rezaei Tavabe[2], Gholamreza Rafiee[3], Bahman Jamshidi[4*]

1. Ph.D Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Professor, Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. M.Sc. Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 03-Jan-2021 **Accepted: 23-May-2021**

Abstract

Strengthen defense mechanisms with immune system stimulants like probiotics, it is a good way to prevent diseases and increase the efficiency of reproduction and breeding in fishers. *Bacillus* and *Lactobacillus* are a group of gram-positive bacteria and previous studies have shown that the use of these bacteria improves immunity and reproductive factors in aquaculture. In this study, the combined effects of optimal concentrations of two probiotics, Bacillus and Lactobacillus, on qualitative indicators including: larval stage index (LSI), larval condition index (LCI), larval dry weight, larval survival, Simultaneity of larval maturation to post larvae, time of emergence of first post larvae, duration of larval period and salinity and formalin stress tests in order to investigate Improvements in qualitative growth indices and immune system of Vannami shrimp larvae were examined. For this purpose, two concentrations of 3×10^5 (B_1) and 6×10^5 (B_2) CFU/g from of bacterial suspension mixtures *Bacillus* probiotic and two concentrations of 3×10^6 (L_1) and 6×10^6 (L_2) CFU/g from of bacterial suspension mixtures probiotic *Lactobacillus* in combination includes: B_1L_1, B_1L_2, B_2L_1 and B_2L_2 were added to the water of Vannami shrimp larval reservoirs. The results showed that the larval quality indices at different levels of combined probiotics differed significantly from the control treatment and the best results were at level 4, respectively: Survival was 61±3.41, dry weight was 143±5.48, larval maturation reached was 1.26±0.02, the time of emergence of the first larval post was 7.5±0.82, the length of the larval period was 8.4±0.15. The two indices of larval stage index and larval status index were examined on the third, sixth and ninth days. The results showed a significant difference between the control group and other combination treatments, and no significant difference between combination treatments for both indices. Salinity and formalin stress tests also showed significant differences between the control group with different levels of combined probiotics for all indicators. Finally, the most important quality indicators of larvae 31% increase in survival, 30% increase in dry weight, 33.8% improvement in the synchronization index of larvae reaching post-larvae, 14.7% decrease in the time of emergence of the first post-larvae and 20% reduction in larval duration was observed at level 4.

Key words: *Bacillus, Lactobacillus, Litopenaeus vannamei, LSI and LCI index*

Corresponding author: Kamran Rezaei Tavabe Email: krtavabe@ut.ac.ir

۱. مقدمه

تأثیرات مثبت پروبیوتیک ها بر آبزیان پرورشی برجنبه های مختلفی نظیر بهبود پارامتر های فیزیکی و شیمیایی محیط آبی پرورش، ارتقا عملکرد رشد و نمو آبزیان پرورشی و نیز پیشگیری با عوامل بیماری‌زا در تحقیقات زیادی توسط محققان تایید شده است (Irianto and Austin, 2002). تغییر جمعیت میکروبی روده لاروهای آبزیان با استفاده از باکتری‌ها انتخابی برای بهینه سازی آنها به‌منظور رشد و بازماندگی بیشتر، از جنبه‌های مهم استفاده از پروبیوتیک‌هاست (Ringo and Birkbeck., 1999) که با تولیدات متابولیسمی، از تشکیل کلونی یا رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها در جداره بافت روده جلوگیری نموده و با ایجاد رقابت برای کسب منابعی مانند مواد مغذی یا فضا از میزبان‌شان نسبت به عوامل بیماری‌زا حفاظت می‌کنند و نیز باعث تولید برخی ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک می‌شود (Vine *et al.*, 2006). باکتری‌های لاکتوباسیلوس گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل، غیراسپورزا، کاتالاز و اکسیداز منفی و بی‌هوازی یا بی‌هوازی اختیاری‌اند که می‌توانند در فرایند حذف رقابتی موجب حذف پاتوژن‌های باکتریایی بیماری‌زا شود (Narmatha *et al.*, 2017). باکتری‌های باسیلوس نیز شامل باکتری هایی بزرگ، گرم مثبت و میله‌ایی که اغلب هوازی اجباری یا بی هوازی اختیاری می‌باشند.

مطالعات اخیر نشان داده که استفاده از بعضی باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک باعث ارتقای شاخص‌های تولید مثلی، رشد و سیستم ایمنی در میگوها شده‌اند (Nimrat *et al.*, 2013) که در بین آن‌ها باکتری‌های گرم مثبت نتایج بهتری نشان داده‌اند (Kumar *et al.*, 2016). همچنین اثر ترکیب پروبیوتیکی دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) و الکتوباسیلوس پالنتروم (*Lactobacillus Plantarum*) بر روی میگوی پا سفید غربی بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش معنی‌دار وزن در تیمارهای ترکیبی را نشان داد (Hasani Azhdari *et al.*, *2020*). در این راستا تحقیقی در زمینه تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلی بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد شامل GH وIGF انجام شد و نتایج نشان داد باکتری فوق تاثیر مطلوبی بر بیان هر دو ژن مرتبط با رشد مذکور دارد و باعث افزایش معنی‌داری در رشد بچه‌ماهی کپور شده است (Niki-maleki *et al.*, 2016). همچنین در پژوهشی دیگر افزودن پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* تجاری و بومی سبب بهبود در افزایش رشد، ضریب تبدیل غذایی و بازماندگی بر روی میگوی پا سفید غربی شد (Abdollahi-Arpanahi *et al.*, 2018).

رشد و نمو همزمان لارو آبزیان در یک دوره تکثیر و پرورش از اهمیت بالایی در مدیریت پرورش لاروی برخوردار است. از سویی دیگر آبزیان دریایی در مراحل لاروی حساسیت بیشتری به استرس‌های محیطی دارند که این موضوع از دلایل مهم کاهش تولید در بسیاری از مزاع تکثیر و پرورش می‌باشد از اینرو مطالعه در زمینه همزمان‌سازی رشد و نمو و مقاوم سازی لارو آبزیان دریایی اهمیت ویژه‌ای برای تولید دارد (Burr and Gatlin, 2005). میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) یکی از مهمترین گونه‌های میگوی پرورشی رایج در دنیا می‌باشد، افزایش میزان مصرف این میگو باعث شده تا از نظر مطالعات پژوهشی نیز بیشتر مد نظر قرار بگیرد. رشد این گونه نسبت به سایر گونه‌های پرورشی بهتر بوده، به نحوی که به g ۳ افزایش وزن در هفته می‌رسد (Wyban and Sweeny., 1991). از دیگر مزایای پرورشی این میگو، می‌توان به تراکم‌پذیری بالا و تحمل دمای پایین آب، دامنه تحمل شوری بسیار وسیع، نیاز کمتر به پروتئین در جیره غذایی، امکان تهیه مولدین کارآمد از میگوهای پرورشی، بالا بودن نسبت بازماندگی پست‌لاروها و مقاومت مناسب این گونه نسبت به عوامل بیماری‌زا اشاره نمود (Briggs *et al.*, 2004).

در مطالعه حاضر سعی شده است اثر استفاده سوسپانسیون ترکیبی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس و باسیلوس در مقادیر بهینه هر کدامیک از پروبیوتیک‌ها در آب مخازن لاروی میگوی پا سفید غربی بر بهبود شاخص‌های

کیفی لاروی میگو پاسفید غربی و میزان مقاومت در برابر استرس‌های شوری و فرمالین پرداخته شود.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش از دو پروبیوتیک باسیلوس (حاوی گونه‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis*) و لاکتوباسیلوس (حاوی گونه‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei*) تولید شرکت تک ژن تهران[1] استفاده شد. همچنین محل انجام پژوهش در شرکت هرمزلارو واقع در بندر کوهستک شهرستان میناب استان هرمزگان انجام شد و نیز لاروهای مورد نیاز از همین شرکت پس از تکثیر مولدین تهیه گردید. آزمایش در مخازن L ۲۰ از جنس فایبرگلاس و با حجم L ۱۰ از آب فیلتر شده مورد استفاده در کارگاه تکثیر با شوری ۳۰ppt، دمای °c ۳۰ آبگیری شدند.

۲.۱. تهیه لاروهای مورد نیاز

پس از تخم‌ریزی مولدین و در پی آن تفریخ تخم‌ها و تبدیل شدن به ناپلیوس، با شمارش ناپلیوس‌ها به روش حجمی، با تراکم ۱۰۰۰ nauplii/l جداسازی و تا مرحله زوا ۱ نگهداری شدند و سپس ناپلی‌ها به تیمارهای آزمایشی اضافه و هوادهی انجام گردید. تغذیه لاروها از مرحله زوا ۱ هر ۴ ساعت با جلبک کتوسروس (*Chaetoceros sp*) و جلبک اسپرولینای (*Spirulina sp*) با تراکم cells/ml ۳۰۰۰۰ و از مرحله زوا ۲ با ناپلی آرتمیا با تراکم ۱۵nauplii/ml در دو وعده صبح و عصر ادامه یافت.

۲.۲. افزودن پروبیوتیک به مخازن نگهداری لارو

۲.۲.۱. تعیین غلظت بهینه پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس

جهت تعین غلظت بهینه، یک پیش آزمایش با غلظت‌های مختلف هر دو پروبیوتیک انجام شد. در پیش آزمایش انجام شده غلظت استوک اصلی پروبیوتیک ۶×۱۰^{۱۱} بود که با رقیق‌سازی سریالی به دوزهای موردنظر رسیده شد. نتیجه پیش آزمایش با توجه به بیشترین بازماندگی نشان داد غلظت‌های CFU/g ۳×۱۰^{۵} (B1) و ۶×۱۰^{۵} (B2) برای پروبیوتیک باسیلوس و غلظت‌های CFU/g ۳×۱۰^{۶} (L1) و ۶×۱۰^{۶} (L2) برای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس غلظت‌های بهینه می‌باشند. سپس این غلظت‌ها بصورت دو به دو با هم ترکیب و تاثیر مخلوط سوسپانسیونی آن‌ها بر شاخص‌های لاروی میگوی وانامی با هدف بهبود تاثیرگذاری پروبیوتیک‌ها به صورت مخلوط سوسپانسیونی نسبت به استفاده جداگانه مورد سنجش قرار گرفت (Hasani Azhdari *et al.*,2020).

۲.۲.۲. افزودن پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس

آزمایش شامل یک تیمار شاهد، و چهار مخلوط باکتریایی ترکیبی از پروبیوتیک‌ها به صورت مخلوط باکتریایی ۱ (B1L1)، مخلوط باکتریایی ۲ (B1L2)، مخلوط باکتریایی ۳ (B2L2) و مخلوط باکتریایی ۴ (B2L2) از پروبیوتیک‌های باسیلوسی و لاکتوباسیلوسی در آب مخازن لاروی میگوی وانامی بود که به صورت روزانه به مخزن پرورش لارو همراه با تعویض روزانه ٪۱۰۰ آب اضافه شد و تاثیر آن بر تغییر شاخص‌های لاروی میگوی وانامی مورد سنجش قرار گرفت.

۲.۳. شاخص‌های کیفی مورد بررسی مراحل لاروی میگو پا سفید غربی

۲.۳.۱. شاخص مرحله لاروی[2](LSI)

این شاخص یکی از پارامترهای مهم در بررسی رشد لاروی سخت‌پوستان است. در این روش در روز سوم، ششم و نهم پرورش لاروی از هر تیمار تعداد ۳۰ قطعه

[1] نشانی: تهران، شهرک صنعتی صفادشت، بلوار فرودین، نبش نهم شرقی کوچه سپر، پلاک ۱. شماره تماس: ۰۲۱۵۴۷۵۱۰۰۰

[2] Larval Stage Index

لارو انتخاب شدند و شاخص تکوینی لاروی طبق معادله زیر محاسبه گردید: (Uno and Kwon, 1969)

معادله (۱) $LSI=\sum Si/N$

Si= مرحله تکوین لاروی (i=1 تا 12)

N= تعداد لاروهای نمونه برداری شده

۲.۳.۲. شاخص وضعیت لاروی[1](LCI)

LSI شاخصی کاربردی و مهم برای ارزیابی کیفی لارو میگو است در واقع این شاخص با ارزیابی ۱۰ مورد از وضعیت کیفی ظاهری لارو و امتیازدهی به صورت اختصاصی برای لارو میگو ارائه می‌گردد. جهت اندازه‌گیری شاخص لاروی در روز سوم، ششم و نهم پرورش لاروی از هر تیمار تعداد ۳۰ قطعه لارو انتخاب شدند و شاخص وضعیت آنها طبق رابطه تایمن و براون به صورت زیر محاسبه گردید: (Tayamen and Brown, 1999)

معادله (۲) $LCI = \Sigma P. (10N)-1$

P= امتیاز ثبت شده برای لارو است

N= تعداد لاروهای نمونه برداری شده

۲.۳.۳. وزن خشک لارو

وزن خشک بر اساس دستورالعمل (Nhan *et al.*, 2009) با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مطالعه ۳۰ قطعه لارو در پایان دوره لاروی نمونه برداری و وزن خشک پس از ۲۴ ساعت قرارگیری نمونه‌ها در آون با دمای ۱۰۰ °c تعیین شد.

۲.۳. ۴. درصد بازماندگی لارو

درصد بازماندگی لاروها بر اساس دستورالعمل (New and William, 2003) انجام شد. بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مورد مطالعه ۳۰ قطعه لارو در پایان دوره لاروی نمونه برداری و درصد بازماندگی آنها محاسبه شد.

۲.۳. ۵. همزمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (Ts)

جهت محاسبه این شاخص، مدت زمانی که طول کشیده تا ۹۰ درصدلاروها به پست‌لارو تبدیل شوند را از مدت زمانی که طول کشیده تا ۱۰ درصدلاروها به پست‌لارو تبدیل شوند با استفاده از رابطه زیر از هم کم کرده و شاخص مورد نظر را محاسبه می‌کنیم (Perumal *et al.* , 2015).

معادله (۳) $T_S=T_{90}-T_{10}$

T90= مدت زمان که طول کشیده تا ۹۰ درصد لاروها به پست‌لارو تبدیل شوند

T10= مدت زمانی که طول کشیده تا ۱۰ درصدلاروها به پست لارو تبدیل شوند

۲.۳. ۶. زمان پیدایش اولین پست‌لارو

جهت محاسبه این شاخص، با توجه به بررسی مداوم در پایان مراحل لاروی (مایسیس ۲ و ۳)، پس از مشاهده اولین پست‌لاروها، مدت زمان پیدایش اولین پست‌لارو از زمان تفریخ تا PL_1 ثبت گردید (Perumal *et al.* , 2015).

۲.۳.۷. طول دوره لاروی

این شاخص با اندازه‌گیری مدت زمانی (روز) که لاروها به طور کامل به پست‌لارو تبدیل می‌شوند (شامل طول مرحله ناپلیوس، زوا و مایسیس)، انجام گردید.

۲.۳.۸. تست‌های استرس

تست‌های استرس شوری و فرمالین در مرحله PL_1 طبق دستورالعمل (Kitsawat and Chuchot, 1991) انجام شد. بدین منظور تعداد ۳۰ عدد لارو از هر تیمار برداشت نموده و در مخازن کوچک و در ۳ تکرار ۳۰ عددی در معرض شوری 10ppt و فرمالین ۱۰۰ppm به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. در پایان هر مرحله تلفات لاروها شمارش و ثبت شده و درصد بقا محاسبه گردید.

۲.۳.۹. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آزمایشی این پژوهش طرح کاملا تصادفی بود که

[1] Larval Condition Index

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوطه از نرم‌افزار SPSS-22 و Exel-2016 استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها در تیمارهای جداگانه با آزمون لون (leven)، برای بررسی اختلاف معنی‌دار از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. لازم به‌ذکر است در کلیه نمودارها و جداول حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵). همچنین تمامی مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام گردید.

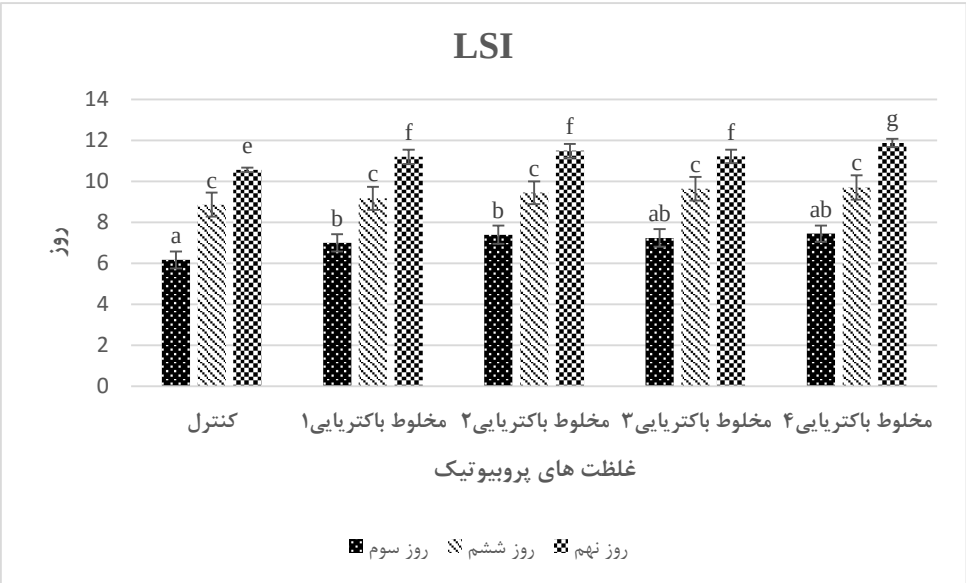
۳. نتایج

۳.۱. شاخص مرحله لاروی (LSI)

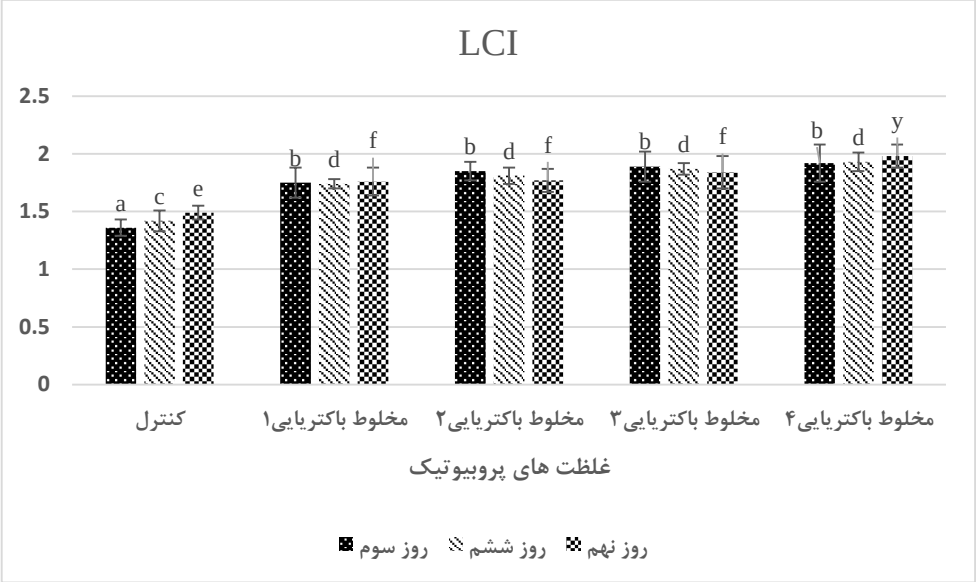
شاخص مرحله لاروی طی روزهای سوم، ششم و نهم لاروی برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده برای مخلوط‌های باکتریایی مختلف در روز سوم، ششم و نهم لاروی نشان داد بیشترین مقدار مربوط به مخلوط باکتریایی ۴ و کمترین مقدار مربوط به مخلوط باکتریایی ۱ بوده و در روز سوم مخلوط باکتریایی ۱ و ۲ دارای اختلاف معنی‌داری با کنترل می‌باشد. در روز ششم بین مخلوط‌های باکتریایی مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در روز نهم لاروی نیز اختلاف معنی‌داری بین مخلوط باکتریایی ۱، ۲ و ۳ با کنترل و مخلوط باکتریایی ۴ با سایر تیمارها مشاهده گردید ولی بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار۱).

۳.۲. شاخص وضعیت لاروی (LCI)

نتایج شاخص وضعیت لاروی طی روزهای سوم، ششم و نهم لاروی برای مخلوط‌های باکتریایی مورد آزمایش با گروه کنترل تماما دارای اختلاف معنی‌دار بود اما هیچگونه اختلاف معنی‌داری را بین مخلوط‌های باکتریایی مختلف پروبیوتیک در مخلوط‌های ۱ تا ۴ به جز روز نهم مخلوط باکتریایی ۴ نشان نداد. همچنین بیشترین مقدار LCI مربوط به مخلوط باکتریایی ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به مخلوط باکتریایی ۱ می‌باشد (نمودار۲).



شکل ۱. نمودار میانگین شاخص مرحله لاروی برای مخلوط‌های باکتریایی بهینه مختلف پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس در روزهای متفاوت. حروف لاتین غیرمشترک در بالای ستون ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح (P<۰/۰۵) است.



شکل ۲. نمودار میانگین شاخص وضعیت لاروی برای مخلوط‌های باکتریایی بهینه مختلف پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس در روزهای متفاوت. حروف لاتین غیرمشترک در بالای ستون ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح (P<۰/۰۵) است.

۳.۳. وزن خشک لارو

شاخص وزن خشک در پایان دوره لاروی برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده برای مخلوط‌های باکتریایی مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) بین گروه کنترل و تیمار مخلوط باکتریایی ۱ با سایر تیمارها بود و همچنین عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمار های مخلوط باکتریایی ۲، ۳ و ۴ را نشان داد (جدول ۱).

۳.۴. درصد بازماندگی لارو

نتایج بدست آمده برای مخلوط‌های باکتریایی مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و مخلوط باکتریایی ۱ با مخلوط باکتریایی ۳ و ۴ بوده ولی با مخلوط باکتریایی ۲ اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین بین مخلوط باکتریایی ۴ با مخلوط باکتریایی ۳ و ۲ نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱).

۳.۵. همزمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (Ts)

شاخص همزمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو (TS بر حسب روز) برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده برای مخلوط‌های باکتریایی مختلف پروبیوتیک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی گروه کنترل، مخلوط باکتریایی ۱ و ۲ با مخلوط باکتریایی ۳ و ۴ بوده که کمترین مقدار آن در مخلوط باکتریایی ۳ (۱,۲۵±۰,۰۴ روز) مشاهده گردید (جدول ۱).

۳.۶. طول دوره لاروی

نتایج بدست آمده طول دوره لاروی برای مخلوط‌های باکتریایی مختلف آزمایش پروبیوتیک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و مخلوط باکتریایی ۱ با مخلوط باکتریایی ۲، ۳ و ۴ و همچنین مخلوط باکتریایی ۲ با مخلوط باکتریایی ۴ بود. بیشترین مقدار طول دوره لاروی در تیمار کنترل و (۱۰,۵۲±۰,۴۸ روز) و کمترین مقدار آن در تیمار مخلوط باکتریایی ۴ (۸,۴±۰,۱۵ روز) مشاهده گردید (جدول ۱).

۳.۷. آزمایش‌های استرس شوری و فرمالین

میانگین درصد بقا لاروها در مرحله PL_1 با تست شوری ۱۰ ppt و فرمالین ۱۰۰ ppm در زمان ۶۰ دقیقه

در جدول ۲ ارائه گردید. میانگین درصد بقا در تست شوری و فرمالین اختلاف معنی‌داری بین تیمار کنترل و تیمارهای آزمایشی مخلوط‌های باکتریایی ۱ تا ۴ نشان داد هرچند تفاوت معنی‌داری بین مخلوط باکتریایی ۱ تا ۴ مشاهده نگردید.

جدول ۱. شاخص‌های کیفی مورد مطالعه لارو میگوی پا سفید غربی برای مخلوط‌های باکتریایی بهینه مختلف پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس. حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵)

شاخص‌ها	کنترل	مخلوط‌باکتریایی ۱	مخلوط‌باکتریایی ۲	مخلوط‌باکتریایی ۳	مخلوط‌باکتریایی ۴
بازماندگی (%)	۳۰±۳/۴۷ a	۳۳±۱/۸۵ a	۴۴±۲/۳۸ b	۵۲±۴/۴۲ b	۶۱±۳/۴۱ c
وزن خشک (µg)	۱۱۰±۶/۹۸ a	۱۱۹±۵/۶۵ a	۱۳۲±۳/۶۱ b	۱۳۶±۹/۱۱ b	۱۴۳±۵/۴۸ b
همزمانی رسیدن لاروها به پست لارو(d)	۱/۸۹±۰/۱۵ a	۱/۷۸±۰/۱۱ a	۱/۶۲±۰/۱۳ a	۱/۲۵±۰/۰۴ b	۱/۲۶±۰/۰۲ b
زمان پیدایش اولین پست لارو (d)	۸/۸±۰/۵۲ a	۸/۴±۰/۵۵ a	۸/۱±۰/۸۵ a	۷/۷±۰/۹۲ a	۷/۵±۰/۸۲ a
طول دوره لاروی (d)	۱۰/۵۲±۰/۴۸ a	۱۰/۵۱±۰/۲ a	۹/۷۸±۰/۲۶ b	۸/۹۱±۰/۵۱ bc	۸/۴±۰/۱۵ c

جدول ۲. تست‌های استرس شوری و فرمالین بر روی لارو میگوی پا سفید غربی. حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵).

تیمارها	بقا (٪)
آزمایش شوری ۱۰ ppt	
کنترل	۳۱± ۴/۱۷ a
مخلوط باکتریایی ۱	۴۶±۹/۴۷ b
مخلوط باکتریایی ۲	۵۶±۵/۸۷ b
مخلوط باکتریایی ۳	۶۰±۹/۲۸ b
مخلوط باکتریایی ۴	۶۶±۱۳/۴۷ b
آزمایش فرمالین ۱۰ppm	
کنترل	۳۶±۸/۳۶ a
مخلوط باکتریایی ۱	۵۶±۲/۰۸ b
مخلوط باکتریایی ۲	۶۶±۱۰/۹۶ b
مخلوط باکتریایی ۳	۶۳±۳،۵۱ b
مخلوط باکتریایی ۴	۷۰±۹/۱۶ b

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

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, Castex *et al.*, 2009). چنان‌که از نتایج این پژوهش برمی‌آید، با توجه به افزایش قابل قبول و معنی‌دار رشد و همچنین افزایش بقا بخصوص در تست‌های استرسی بیانگر استقرار باکتری‌های مورد استفاده در دستگاه گوارش لارو میگوی پاسفید غربی می‌باشد. اما مسئله مهمی که تواند سته به استقرار پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش آبزیان کمک کند مرحله رشدی آبزی مورد نظر است، زیرا تاثیر گذاری این باکتری ها در مراحل لاروی به منظور شکل‌گیری و

کلونی سازی در دستگاه گوارش بسیار آسان‌تر می‌باشد (Fuller, 1992). در همین راستا در پژوهشی با بررسی *Bacillus coagulans* بر میگوی وانامی از مرحله زوآ تا PL_8 دریافتند که این پروبیوتیک می‌تواند تاثیر معنی‌داری بر شاخص رشد داشته باشد زیرا دستگاه گوارش میگو در مرحله لارو و پست لارو تکامل می‌یابد، بنابراین پروبیوتیک می‌تواند از طریق افزایش آنزیم های گوارش بهترین تاثیر را داشته باشد (Zhou *et al.*, 2008) که نتایج فوق با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد که استفاده از مخلوط‌های باکتریایی باکتری‌های گرم‌مثبت در پرورش آبزیان می‌تواند کربن آلی را در طی چرخه پرورش به دی‌اکسیدکربن تبدیل کرده و تولید فیتوپلانکتون‌ها را افزایش دهد. این مسئله در پرورش لاروی میگوهای دریایی بسیار مهم و موثر می‌باشد در همین راستا محققان در مطالعه‌ای جدید در پژوهش خود تایید کردند استفاده همزمان از مخلوط باکتریایی *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus lantarum* در آب مخازن پرورش میگوی پاسفید غربی بر فاکتورهای رشد و بازماندگی آن تاثیر مثبت دارد (Azhdari *et al.*, 2020). با این حال محققان دیگر در تحقیق خود دریافتند که هیچ تفاوتی در رشد و بازماندگی میگو سفید هندی (*Fenneropenaeus indus*) در مراحل پست‌لاروی هنگامی که پروبیوتیک‌های باسیلوسی به آب اضافه می‌شوند یا زمانی که با آرتمیا غنی شده به پست‌لاروها داده شدند وجود ندارد (*Ziaei-nezhad et al.*, 2006).

افزایش میزان بازماندگی در این تحقیق می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد. همانگونه که در تحقیقات قبلی بیان شده است باسیلوس و لاکتوباسیلوس‌ها قادرند با سایر باکتری‌ها رقابت کنند و نیز برای مواد غذایی و سطح با سایر باکتری‌های محیط رقابت کنند و نیز نشان داده شده است این پروبیوتیک‌ها در محیط و دستگاه گوارش می‌توانند جایگزین گونه‌های ویبرو، که باکتری‌های عمده محیط دریایی هستند شوند (Rengpipat *et al.*, 2000). تعدادی مکانیسم عملکردی برای کارایی پروبیوتیک معرفی شده است که از جمله این راه‌کارها شامل چسبیدن به دیواره دستگاه گوارش برای جلوگیری از کلونیزه شدن عوامل بیماری‌زا، خنثی‌سازی سموم، فعالیت باکتریوسین‌ها و افزایش توانایی سیستم ایمنی بدن می باشد (Fernandez *et al.*, 2011). همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تولید ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها، سیدروفرها، لیزوزیم‌ها، پروتئازها، هیدروژن پراکسیدها و جلوگیری از کلونی‌سازی باکتری‌های مضر در روده، رقابت جهت مصرف مواد مغذی و ارتقای سیستم ایمنی آبزی به‌وسیله‌ی تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی را افزایش و باعث ارتقا بقای آبزیان شوند (Saurabh and Sahoo, 2008). افزایش نرخ بقا در میگوهای تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی ممکن است به واکنش ایمنی پروبیوتیک ها بر میزبان مرتبط باشد. همچنین افزایش رشد ممکن است در نتیجه افزایش اشتها، افزایش قابلیت هضم و جذب مواد غذایی و در نتیجه بهبود ضریب تبدیل غذایی باشد (Gatesoupe, 1999). سایر شاخص‌های وابسته به رشد مانند وزن خشک لارو، طول دوره لاروی، زمان پیدایش اولین پست‌لارو، شاخص وضعیت لاروی (LCI) و شاخص مرحله لاروی (LSI) نیز تحت تاثیر فاکتورها رشد بهبود پیدا خواهند کرد.

استفاده از پروبیوتیک‌های باسیلوسی و لاکتوباسیلوسی می‌تواند سبب بهبود تعادل میکروبی روده، بهبود فاکتور های کیفی آب محیط پرورش، بهبود وضعیت سیستم ایمنی، بهبود کارایی تغذیه‌ای و هضم غذا، افزایش رشد و پوست‌اندازی و به دنبال آن بهبود شاخص مرحله تکوینی لارو نیز شود، پروبیوتیک‌های باسیلوس در روده آنزیم‌هایی را که در هضم یا جذب مواد اساسی دخیل هستند تولید یا ترشیح آنها را تحریک می‌کنند (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). در این راستا رئیسی و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقات خود دریافتند که استفاده از مخلوط‌های باکتریایی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus Licheniformis* تاثیر بسزایی در قابلیت هضم اسیدآمینه‌ها و در پی آن رشد داشته است که دلیل آن را به افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان

بیان کرده‌اند (Reisi *et al.*, 2015) که نتایج مطالعه حاضر از لحاظ دستاوردهای رشد و نمو با مطالعه قبلی همخوانی دارد به صورتی که در مخلوط‌های باکتریایی ۲، ۳ و ۴ میزان رشد اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشته است بطوریکه در مخلوط باکتریایی ۴ در حدود ۳۳ µg میکرو گرم افزایش وزن نسبت به گروه شاهد به وجود آمده است. در مطالعه‌ای دیگر بیان شده است که استفاده از پروبیوتیک باسیلوس، می‌تواند میزان بقارا در مقایسه با تیمارهای بدون پروبیوتیک افزایش می‌دهد (Talpur *et al.*, 2013) که نتایج مطالعه حاضر در خصوص بهبود فاکتور بازماندگی نیز در برخی تیمارهایی که تحت تاثیر مخلوط پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس قرار گرفته‌اند با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد و طبق نتایج بدست آمده در جدول شماره ۱ در مخلوط باکتریایی ۴ بیشترین اختلاف بازماندگی در حدود ۳۱ درصد افزایش بقا در طول دروه ثبت شده است که هم با گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. افزایش میزان مقاوت در برابر استرس‌های شوری و فرمالین نیز همانگونه که در تحقیقات قبلی نشان داده شده است علاوه بر تاثیرگذاری این باکتری‌ها در سیستم ایمنی غیراختصاصی و فعال‌سازی ایمنی سولی و هومورال می‌تواند با کاهش سطح هورمون کورتیزول که به طور مستقیم در پاسخ‌های استرسی دخیل است در رابطه دانست (Carnevali *et al.*, 2006). داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از مخلوط‌های باکتریایی پروبیوتیک باسیلوس و لاکتوباسیلوس در آب مخازن لاروی میگوی وانامی، سبب بهبود شاخص مرحله لاروی (LSI) و شاخص وضعیت لاروی (LCI) و همچنین افزایش درصد بقا در مخلوط‌های باکتریایی از هر دو پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد شد که این امر احتمالا ناشی از تاثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر میزان رشد لاروها می‌باشد. همچنین درصد بقا در آزمایش های تحت تنش های شوری و فرمالین بیانگر تاثیر مطلوب این باکتری‌های سودمند بر سیستم‌ایمنی لارو میگوی پاسفید غربی می‌باشد. در این آزمایش بیشترین اختلاف بقا در آزمایش شوری و فرمالین مربوط به مخلوط باکتریایی ۴ بود که به ترتیب ۳۵ و ۳۴ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش بقا را نشان داد. مطالعات قبلی در این زمینه نشان داده است باسیلوس و لاکتوباسیلوس‌ها با تحریک سیستم ایمنی بدن پست‌لارو ها موجب افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی می‌شوند (Panigrahi *et al.*, 2005).

نتیجه‌گیری نهایی

در نهایت نتایج این پژوهش نشان داد مخلوط باکتریایی پروبیوتیک‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس تاثیر مثبتی بر شاخص‌های کیفی شامل شاخص مرحله لاروی، شاخص وضعیت لاروی، در صد بازماندگی لارو، همزمانی رسیدن لاروها به پست‌لارو، طول دوره لاروی و مقاومت در برابر استرس شوری و فرمالین بخصوص در غلظت‌های بالاتر مخلوط باکتریایی پروبیوتیک‌ها نسبت به گروه شاهد داشته است.

۵. منابع

References

Abdollahi-Arpanahi, D., Soltani, E., Jafaryan, H., Soltanic, M., Naderi-Samani, M., Campa-Cordovae, A., 2018. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 496, 43-49.

Briggs, M., 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication 10. 92.

Burr, G., Gatlin, D., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society* 36(4), 425-436.

Carnevali, O., Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, L., Silvi S., and Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression, *Aquaculture* 258, 430–438.

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(3), 306-313.

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.

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

Gatesoupe, F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180(1-2), 147-165.

Green, S. 1999. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *Journal of medical virolog*y 59(3), 329-334.

Hasani Azhdari, M., Rezaei Tavabe, K., Hoseini, V., Bagherii, D., Frinsko, M., Ghesemi, A., Azhdari, A., Vazirzadeh, A., Khalilpazir, M., 2020. Evaluation of the effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* probiotics in tank water on growth factors and carcass quality of the western white leg shrimp *(Letopenaeus vannamei)*. *Journal of Fisheries* 73(3), 455-470 (in Persian).

Hoseinifar, S., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Vakili, F., 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail *Xiphophorus helleri*. *Fish and Shellfish Immunology* 42(4), 533- 538.

Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K.F., Rossen, L., Nielsen, T., Gram, L., 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 96(2), 117-132.

Irianto, A., Austin, B., 2002. *Probiotic in aquaculture, Journal of Fish Diseases, 25, 1- 10*Briggs, M. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication 10. 92.

Kitsawat, P., Chuchot S., 1991. Acute toxicity of formalin to giant freshwater prawn *Macrobranchium rosenbergii*. *King Mongkut's Agricultural Journal*, 9, 45-52.

Kumar, V., Roy, S., Meena, K., Sarkar, U., 2016. Application of probiotics in shimp aquaculture: mechanisms of action and methods of administration. Reviews in Fisheries Science and *Aquaculture* 24, 342–368.

New, W.H., William, H., 2003. A history of Canadian literature. Vol. 5149. McGill-Queen's Press-MQUP. 514 pp.

Nhan, R., Tom, Ch., 2009. Classifying affective states using thermal infrared imaging of the human ace. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 57(4), 979-987.

Niki-maleki, Z., Shabani, A., Safari, R., 2019. Effects of separate and combined use of probiotics *(Lactobacillus casei)* and prebiotics MAX-A in the diet on the expression of growth-related genes (GH and IGF1) in common carp *(cyprinus carpio)*. *Journal of Animal Environment*. 11th year, No. 4. 229-234 (in persian).

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(2), 655–666.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. Sugita, H., 2004. Immune responses inrainbow trout, Onchorhynchus mykiss, induced by apotential probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* JCM.1136. Vet. Immunol. *Immunopathol.* 102: 379-388

Perumal, S., Thirunavukkarasu, A., Pachiappan, P., 2015. Marine and Brackishwater Aquaculture.*Springer Nature*. P 262.

Reisi, H., Jafari, V., Ziyaeinezhad, S., Pasandi, A., 2015. Evaluation of the effect of probiotics *Bacillu ssubtilis* and *Bacillus licheniformis* on density and Digestibility of *Litopeneaus vannamei* shrimp. *Journal of Animal Environment*. 7th year, number 2. 231-238 (in persian).

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.

Ringo, E., Birkbeck, T. 1999. Intestinal microflora of fish and fry. *Aquaculture Research* 30(3), 73-93.

Ringo, E., Olsen, R., Gifstad, T., Dalmo, R., Amlund, H., Hemre, G., Bakke, A., 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. *Journal of Aquaculture Nutrition* 16(1), 117-136.

Saurabh, S., Sahoo, P., 2008. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39(4), 223–239.

Seenivasan, C., Saravana-Bhavan, P., Radhakrishnan, S., 2011. Effect of probiotics (BinifitTM) on survival, growth, biochemical constituents and energy budget of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Elixir Aquaculture* 41(1-2), 5919-5927.

Stanier, R. 1963. The organization of the photosynthetic apparatus in purple bacteria. The general physiology of cell specialization. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York: 242-252.

Talpur, A., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M., Bolong, A., 2013. Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture* 416(3), 173-178.

Tayamen, M., Brown, J., 1999. A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquacalture Research* 30, 917–922.

Uno, Y., Kwon, C. 1969. Larval development of *Macrobrachiurn rosenbergii* reared in the laboratory. *Journal of the Tokyo University Fisheries* 55(2), 179-191.

Vine, N., Leukes, W., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30(4), 404–427.

Wyban, J., Sweeny, G., 1991. Shrimp health maintenance. Intensive shrimp production technology proceeding. The Oceanic Institute, Hawaii 103-120.

Zhou, X., Wng, Y., Li, W., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp *Penaeus vannamei* based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. Vol. 287, p 349-353.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M., Takami, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A., 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(3), 516-524.

Zokaeifar, H., Balcázar, J., Saad, C., Kamarudin, M., Sijam, K., Arshad, A., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 33(4), 683–689.