شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۴۷۰-۴۵۵

بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) و لاکتوباسیلوس پلانتروم (*Lactobacillus plantarum*) در آب مخازن بر فاکتورهای رشد و کیفیت لاشه میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

سید مهرداد حسنی اژدری[۱]، کامران رضایی توابع[۲*]، سید ولی حسینی[۲]، دارا باقری[۳]، مایک فرینسکو[۴]، سید احمد قاسمی[۵]، اشکان اژدری[۶]، آریا وزیرزاده[۷]، محمد خلیل پذیر[۸]

۱. دانشجوی کارشناس ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
۳. گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس.
۴. دانشگاه ایالت کارولینای شمالی، آمریکا.
۵. گروه زیست فناوری، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر.
۶. مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.
۷. گروه منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۸. پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۰

چکیده

با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها در پرورش میگوهای دریایی، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های باسیلوس سوبتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتروم در آب پرورش بر فاکتورهای رشد و کیفیت لاشه میگوی وانامی بررسی گردید. در این تحقیق، اثرات متقابل دو پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس (B) و لاکتوباسیلوس پلانتارم (L) در ۲ سطح $B1= 10^6$ CFU/gr و $B2= 10^6\times3$ CFU/gr، $L1= 10^5$ CFU/gr و $L2= 10^5\times3$ CFU/gr در آب مخازن پرورش پست لارو میگوی پاسفید غربی به مدت ۲ ماه بررسی شد. فاکتورهای رشد شامل: میزان افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، درصد بازماندگی و میزان چربی و پروتئین لاشه اندازه‌گیری شدند، پس از آن میگوها به فریزر ۱۸- درجه سلسیوس منتقل شده و در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ فاکتورهای کیفی لاشه شامل: آبچک، ظرفیت نگهداری آب، pH، TBA و TVB-N اندازه‌گیری شدند. بیشترین میزان افزایش بدن و ضریب تبدیل غذایی مربوط به تیمار B(L1×B2)، بیشترین درصد بازماندگی مربوط به تیمار E(L2×B1)، بیشترین میزان چربی و پروتئین لاشه به ترتیب متعلق به تیمارهای C(L1×B1) و E(L2×B1) بود. طبق داده‌های بدست آمده از آزمون‌های کیفیت لاشه در شاخص آبچک، ظرفیت نگهداری آب و TBA تاثیرات پراکنده‌ای از سویه‌های مورد استفاده مشاهده گردید در حالی که در شاخص TVB-N و pH در هیچکدام از روزها تاثیر نداشتند. به طور کلی افزودن همزمان سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس و لاکتوبا سیلوس پلانتارم در دوزهای ذکر شده به آب مخازن دارای تاثیر مثبتی بر فاکتورهای رشد دارد. خصوصا اینکه تیمار B(L1×B2) از منظر افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی در وضعیت بهتری نسبت به مابقی تیمارها قرار داشت. به طور کلی طبق نتایج بدست امده از بخش اول و دوم، استفاده همزمان از پزوبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتارم و باسیلوس سوبتیلیس در آب مخازن پرورش میگوی پاسفید غربی بر فاکتورهای رشد آن تاثیر مثبت دارد. با این حال تاثیر آن بر فاکتورهای کیفی لاشه، پراکنده و قابل چشم پوشی بود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، میگو، فاکتورهای رشد، انجماد، کیفیت لاشه

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

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 3, Autumn 2020
pp. 455-470

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*)

Seyed Mehrdad Hasani Azhdari[1], Kamran Rezaei Tavabe[2*], Seyed vali Hoseini[2], Dara Bagherii[3], Mike Frinsko[4], Seyed Ahmad Ghesemi[5], Ashkan Azhdari[6], Arya Vazirzadeh[7], Mohammad Khalilpazir[8]

1. MSc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Fisheries Department, Agriculture and Natural Resources Faculty, Persian Gulf University.
4. North Carolina State University, USA.
5. Department of Biotechnology of faculty of sciences and Biotechnology Institute of Persian Gulf, Persian Gulf University.
6. Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Offshore Research Center, Chabahar, Iran.
7. Natural resources and Environment Department, University of Shiraz.
8. Iranian Shrimp Research Center (ISRC), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran.

Received: 03-Aug-2020 Accepted: 10-Nov-2020

Abstract

Due to the importance of probiotics in marine shrimps farming, this study aimed to investigate the effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantrum* probiotics in tank water on growth factors and carcass quality of the Vanamei shrimp. In this study, the interactions of two probiotics *Bacillus subtilis* (B) and *Lactobacillus plantarum* (L) at 2 levels B1 = 106 CFU / gr and B2 = 106 × 3 CFU / gr, L1 = 105 CFU / gr and L2 = 105 × 3 CFU / gr in the tank water of western white leg shrimp post-larval was evaluated for 2 months. Growth factors including: body weight gain, feed conversion ratio, survival rate and carcass fat and protein were measured, then the shrimp were transferred to the freezer at -18 ° C and on days 1, 15, 30, 45 and 60 carcass quality including: drip lost, water holding capacity, pH, TBA and TVB-N were measured. The highest body growth rate and feed conversion ratio were related to treatment B (L1 × B2), the highest survival percentage was related to treatment E (L2 × B1), the highest amount of carcass fat and protein belonged to treatments C (L1 × B1) and E (L2 × B1). According to the obtained results, carcass quality tests in the drain index, water holding capacity and TBA, scattered effects were observed from the strains used, while in the TVB-N index and pH had no effect during the research period. In general, the simultaneous addition of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarm* strains in the mentioned doses to reservoir water has a positive effect on growth factors. Especially that treatment B (L1 × B2) was in a better condition than other treatments in terms of body weight gain and feed conversion ratio. In general, according to the results obtained from the first and second sections, the simultaneous use of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* in the water of western white leg shrimp tanks has a positive effect on its growth factors.

Key words: Probiotics, Shrimp, Growth factors, Frozen, Carcass quality

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

۱. مقدمه

پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده تعریف می‌شوند که وقتی در مقادیر کافی استفاده می‌شود، بر سلامتی میزبان تأثیر می‌گذارد (Hotel *et al.*, 2001). ورشور و همکاران پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزیان را به صورت یک مکمل میکروبی زنده که از طریق اصلاح فلور میکروبی درون بدن میزبان یا محیط زندگی اطراف آن، با اطمینان از استفاده بهتر از خوراک یا افزایش ارزش تغذیه خود، با افزایش پاسخ میزبان به بیماری، یا بهبود کیفیت محیط زندگی بر میزبان اثر می گذارد" تعریف می‌کنند (Verschuere *et al.*, 2000). انواع مختلفی از میکروآلگ‌ها (تتراسلمیس)، مخمرها (دباریومایسس، فافیا، ساکارومایسس)، باکتری‌های گرم‌مثبت (باسیلوس، کارنوباکتریوم، انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس) و باکتری‌های گرم‌منفی (آئرومونـاس، آلتروموناس، فتورودوباکتریوم، سودوموناس و ویبریو) بعنوان پروبیوتیک بررسی شده‌اند (Kongnum and Hongpattarakere, 2012). گونه های باسیلوس یکی از رایج‌ترین پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی‌پروری است (Irainto *et al.*, 2002). باسیلوس‌ها می‌توانند ترشح آنزیم‌های گوارشی را تحریک کنند، عامل‌های رشد را فعال می‌کنند و ایمنی موجودات آبزی را تنظیم می‌کنند (Wang *et al.*, 2017). ژائو و همکاران گزارش کردند که پروبیوتیک، *B. coagulans SC8168*، که در یک غلظت خاص به عنوان افزودنی درآب مورد استفاده قرار گرفتند، به طور قابل توجهی توانستند میزان بقا و فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی لاروهای میگو را افزایش دهند (Zhao *et al.*, 2009). باسیلوس سوبتیلیس یکی از گونه‌های مورد مطالعه در جنس باسیلوس است. همچنین نشان داده شده است که استفاده از این سویه با بهبود سیستم ایمنی باعث افزایش بقای گونه میگو در برابر پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی می‌شود. باکتری *Lactobacillus plantarum* از نوع میله شکل، گرم مثبت، کاتالیز منفی، بی‌هوازی و فاقد توانایی تشکیل اسپور است که متعلق به باکتری اسید لاکتیک (LAB) می‌باشد و به عنوان یک مکمل رژیم غذایی زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که *Lactobacillus plantarum* می‌تواند ایمنی را بهبود بخشیده (Kongnum *et al.*, 2012) و موجب مقاومت در برابر بیماری و بازماندگی بیشتر شود (Maeda *et al.*, 2014).

میگوی پا سفید غربی *Litopenaeus vannamei* بومی بخش سواحلی اقیانوس آرام مکزیک است که از جنوب به پرو متصل است. *L. vannamei* در بسیاری از کشورهای آسیا، آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی و جزایر اقیانوس آرام به علت بقای بالایی، رشد سریع در سیستم کشت متراکم و تحمل بیماری به طور گسترده‌ای پرورش داده می‌شود (Briggs *et al.*, 2004). به طور کلی میگوی وانامی به دلیل تحمل طیف گسترده‌ای از شوری به عنوان یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی در آبهای لب شور و مناطق دارای آب‌های شیرین و همچنین به دلیل مستعد بودن برای زندگی در آب‌های بسیار شور تا ppt ۵۰ و رشد بسیار خوب در ppt ۴۰ یک انتخاب مناسب برای پرورش در آب های جنوب ایران می باشد. با توجه به پرورش میگوی‌پا سفیدغربی در جهان و ایران و گسترش استفاده از پروبیوتیک ها، مطالعه اخیر جهت تعیین اثر ترکیبی سویه‌های یاد شده بر فاکتورهای رشد و کیفیت لاشه میگوی‌پاسفید غربی صورت پذیرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه پست لارو و ذخیره‌سازی

برای این پژوهش تعداد ۶۰۰ عدد پست‌لارو میگوی پاسفید غربی با وزن هر کدام بین ۰/۵ تا ۱/۵ گرم از پژوهشکده میگوی کشور واقع در شهر بوشهر تهیه و به ایستگاه تحقیقاتی آبزیان دریایی پژوهشکده خلیج فارس واقع در دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر منتقل و به مدت حدود ۲ هفته برای سازگاری در یک تانک ۴۰۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند.

۲.۲. تیماربندی و آماده‌سازی تانک‌ها

این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل در ۴ تیمار و ۳ تکرار به علاوه یک تیمار شاهد انجام شد.

۲.۳. تقسیم پست لاروها در تانک‌ها

پس از طی شدن زمان مناسب برای سازگاری پست‌لاروها تعداد ۳۰۰ عدد پست‌لارو به صورت دسته‌های ۲۰ تایی با مشخص شدن وزن کلی به صورت تصادفی در تانک‌های ۳۰۰ لیتری که ۱۰۰ لیتر آبگیری شده بودند ذخیره سازی شد، در انتهای ذخیره سازی روی تانک‌ها با توری پوشانده شد تا از ورود اجسام اضافی و حشرات و همچنین خروج احتمالی پست‌لاروها جلوگیری شود. پس از گذشت نصف روز پست‌لاروها غذادهی شدند.

۲.۴. تهیه پروبیوتیک

برای این پژوهش از ۲ گونه پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس و لاکتوباسیلوس پلانتارم به صورت پودر تجاری استفاده گردید. برای باسیلوس سوبتیلیس از پروبیوتیک تجاری تک سل محصول شرکت تک ژن با دوز $۲/۵\times۱۰^{۱۱}$ CFU/gr و برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم از پروبیوتیک محصول شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان با دوز ۲×۱۰^{۱۱} CFU/gr استفاده شد.

۲.۵. غذادهی

پست‌لاروها بسته وزن توده و وزن میانگین هر عدد پست‌لارو، ۳ بار در روز به میزان درصد مشخصی از وزن توده غذادهی شدند. غذای مورد استفاده محصول شرکت هوواراش بود.

جدول ۱: آنالیز تقریبی جیره تجاری مورد استفاده بر حسب درصد (٪)

آنالیز شیمیایی	آغازین			رشد		پایانی
(درصد)	۴۰۰۱	۴۰۰۲	۴۰۰۳	۴۰۰۴	۴۰۰۵	۴۰۰۶
پروتئین خام (حداقل)		۴۰		۲۹	۲۸	۳۶
چربی خام (حداقل)		۸		۷	۷	۶
خاکستر (حداکثر)		۱۱		۱۲	۱۳	۱۳
فیبر (حداقل)		۲		۳	۳	۳
رطوبت (حداکثر)		۱۰		۱۰	۱۰	۱۰

۲.۶. تعویض آب

تعویض آب ۲ بار در هفته به میزان ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد انجام شد.

۲.۷. افزودن پروبیوتیک

مقدار دوزهای مورد استفاده مشخص و وزن مورد نیاز محاسبه گردید، پس از هر بار تعویض آب مقدار پروبیوتیک مورد نیاز به آب افزوده شد.

باسیلوس سوبتیلیس (B) و لاکتوباسیلوس پلانتارم (L) هرکدام با ۲ غلظت مورد استفاده قرار گرفتند که در جدول ۲ دوزهای مختلف مورد استفاده مشخص شده است.

جدول ۲: دوزهای پروبیوتیک مورد استفاده

لاکتوباسلوس پلانتارم	باسیلوس سوبتیلیس
L1= 10^{5} CFU/gr	B1= 10^{6} CFU/gr
L2= $10^{5}\times3$ CFU/gr	B2= $10^{6}\times3$ CFU/gr

۲.۸. مدت زمان پرورش

پست‌لاروها به مدت ۲ ماه پرورش داده شدند. در طول این مدت وزن دوره ای آنها اندازه‌گیری و مقدار غذادهی متناسب با وزن توده تنظیم می‌شد. بعد از اتمام دوره پرورش میگوهای هر تانک به صورت جدا وزن شده و قطع سر شدند. سپس به فریزر ۱۸- درجه سلسیوس منتقل شدند تا برای اندازه‌گیری فاکتورهای کیفی لاشه آماده شوند.

پس از اتمام دوره پرورش شاخص‌های رشد شامل: ضریب تبدیل غذایی FCR، درصد بازماندگی و افزایش وزن بدن، طبق فرمول های زیر اندازه‌گیری شدند (Briggs *et al.*, 2004):

وزن اولیه - میانگین وزن پایانی = افزایش وزن بدن(گرم)

$$\text{ضریب تبدیل غذایی (FCR)} = \frac{\text{میزان غذای مصرفی}}{\text{افزایش وزن بدن}}$$

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد میگوی موجود در استخر}}{\text{تعداد میگوی ذخیره‌سازی شده}} \times ۱۰۰$$

در مرحلهٔ دوم تحقیق، میگوهای فریز شده به آزمایشگاه فراوری آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شدند تا شاخص‌های کیفی لاشه آنها مورد ارزیابی قرار گیرد. شاخص‌هایی نظیر درصدآبچک، ظرفیت نگهداری آب، pH، TBA و TVB-N در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲.۹. ترکیبات لاشه

در ابتدا مقدار مشخصی لاشه از هر تیمار انتخاب و پس از قرار گرفتن در آون با ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت، برای تعیین مقدار چربی و پروتئین به آزمایشگاه گروه علوم دام دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران منتقل شدند.

جدول ۳: تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) درصد رطوبت لاشه‌ها

درصد رطوبت				
شاهد / A	B (L1×B2)	C (L1×B1)	D (L2×B2)	E (L2×B1)
81/4±0.12	80/4±0/17	80/5±1/6	80/4±0/23	81/5±0/91

۲.۱۰. اندازه‌گیری درصد آبچک (Drip lost)

نمونه منجمد وزن شده و سپس رفع انجماد شدند، بعد رطوبت آن توسط دستمال خشک گرفته شد، سپس بار دیگر نمونه وزن شد، درصد آبچک از فرمول زیر محاسبه شد (Santos *et al.*, 1990):

$$\text{درصد آبچک} = \frac{\text{وزن نمونه بعد از رفع انجماد} - \text{وزن نمونه تر}}{\text{وزن نمونه تر}} \times ۱۰۰$$

۲.۱۱. اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب (WHC)

ابتدا چند عدد از کاغذ صافی کاملا خشک را بر روی ترازو گذاشته و وزن آن صفر شد. آنگاه حدود ۱ تا ۲ گرم از نمونه را بر روی کاغذ صافی بصورت یک لایه نازک پخش (قطر تقریبی ۲۵ میلی متر و ضخامت تقریبی ۳ تا ۵ میلی‌متر) و سپس وزن شد (وزن اولیه نمونه). بعد نمونه را به مدت ۵ دقیقه توسط یک وزنه ۲ کیلویی تحت فشار ثابت قرار داده و سپس با تیغه اسکالپل همهٔ نمونه با دقت تمام از کاغذ صافی جدا و دوباره وزن شد (وزن نمونه بعد از فشار). با توجه به میزان آب خارج شده از بافت نمونه تحت فشار، آب قابل تراوش (EW) و ظرفیت نگهداری آب (WHC) بر حسب درصد (٪) از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شوند (Park, 2005):

فرمول شماره ۱:

$$EW = \frac{\text{وزن نمونه بعد از فشار} - \text{وزن نمونه اولیه}}{\text{وزن نمونه اولیه}} \times ۱۰۰$$

فرمول شماره ۲:

$$WHC = \frac{\text{آب تراوش شده (درصد)}}{\text{رطوبت اولیه نمونه (درصد)}} \times ۱۰۰$$

۲.۱۳. اندازه‌گیری pH

مقدار مشخصی از نمونه (حداکثر ۵) گرم خرد شد تا به حالت چرخ شده تبدیل شود، سپس ۹ برابر آن آب مقطر اضاف گردید، بعد به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۸۰ شیک شد تا نمونه و آب مقطر با یکدیگر ترکیب شوند. سپس مایع درون ظرف جدا و توسط دستگاه پی‌اچ متر میزان پی‌اچ آن معین گردید.

۲.۱۴. اندازه‌گیری TBA

۲ گرم از نمونه را با ۸ سی سی اسید کلریدریک ۴ درصد مخلوط و با دور rpm ۱۲۰ و به مدت نیم ساعت شیک شد. سپس مایع نمونه را جدا شده و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ بر دقیقه سانترفیوژ گردید، بعد ۵ سی سی از فاز رویی را با ۵ سی سی از معرف TBA درون لوله آزمایش قرار داده و به مدت نیم ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شد، بعد از خنک شدن محلول را درون دستگاه اسپکتوفوتومتر با طول موج ۵۳۲ نانومتر قرار داده و عدد درج شده روی دستگاه قرائت گردید، بعد از طریق فرمول زیر حساب شد (Pikul *et al.*, 1989):

= عدد مالون‌دی‌آلدئید در هزار گرم گوشت
مقدار جذب قرائت شده × ۵/۱

برای تهیه نمودن ۱۰۰ سی سی معرف TBA مقدار ۱۰۰ سی سی آب مقطر را با ۰/۳ گرم پودر TBA مخلوط می‌شود.

۲.۱۵. اندازه‌گیری TVB-N

۲ گرم از نمونه با ۸ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) را در ظرف مشخصی ریخته (نمونه شاهد بدون افزودن نمونه نیز تهیه می‌شود) و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۸۰ در دقیقه شیک شد. بعد مایع نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از فاز رویی به همراه ۱ میلی‌لیتر محلول کربنات پتاسیم اشباع درون حلقه بیرونی ظرف TVB-N ریخته و همچنین ۱ میلی‌لیتر بوریک اسید به درون حلقه مرکزی آن ریخته شد. ظروف به مدت یک ساعت درون دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد با استفاده از محلول اسید HCL یکصدم نرمال آن را تیتر شد تا رنگ پوست پیازی ظاهر شود، سپس مقدار TVB-N محاسبه شد (Rawdkuen *et al.*, 2010):

$$\text{TVB-N} = \frac{M}{(100)(V)(A-B)(N)14}$$

(بیان شده در میلی گرم ۱۰۰ گرم نمونه)

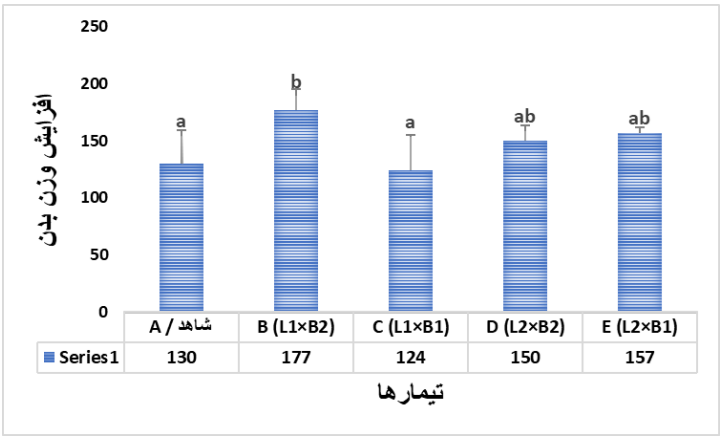
که در آن: N= نرمالیته محلول اسید هیدروکلریک تیتر شده است. A، B= به ترتیب حجم محلول اسید هیدروکلریک تیتر شده در نمونه و خالی. V= حجم کل نمونه آماده استفاده شده؛ M= وزن نمونه در گرم.

۲.۱۶. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از Excel انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسیمرنوف و بررسی همگنی واریانس‌ها با آزمون لون (leven)، برای بررسی اختلاف معنی‌دار در آزمایش از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) در سطح $P<0.05$ و آزمون‌های تکمیلی مانند Duncan استفاده شد.

۳. نتایج

افزایش وزن بدن: در مورد شاخص افزایش وزن بدن، تیمار B بیشترین میزان (۱۷۷) را در سطح معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بعد از آن تیمارهای E (۱۵۷) و D (۱۵۰) نسبت به تیمار شاهد (۱۳۰) افزایش بیشتری داشتند اما این در سطح معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). تیمار C (۱۲۴) نیز افزایش وزن بدن کمتری نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد (نمودار ۱). با توجه به P-Value ثبت شده از سویه‌های پروبیوتیک، اثر متقابل آنها بر روند تغییرات ثبت شده در این شاخص مشهود بود (P=۰/۰۲۹) (جدول ۴).

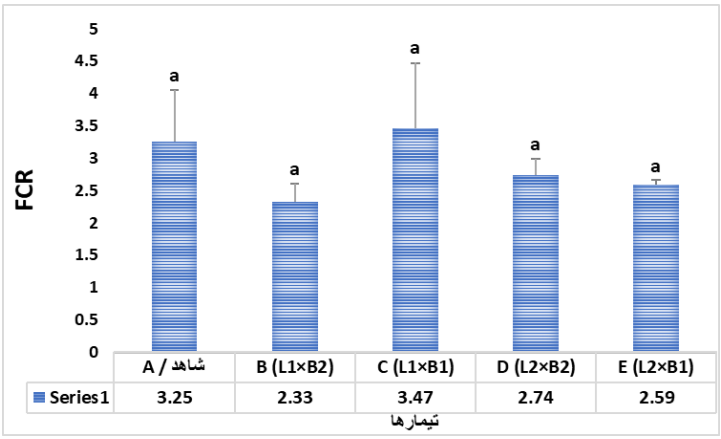


نمودار ۱ - تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص افزایش وزن بدن (گرم) زیست توده میگوها در هر تیمار حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۴-میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده در شاخص افزایش وزن بدن

	F	P-Value
باسیلوس سوبتیلیس	3/931	0/083
لاکتوباسیلوس پلانتارم	0/073	0/794
اثر متقابل هر دو سویه	7/094	0/029

ضریب تبدیل غذایی: با توجه به نتایج بد ست آمده از شاخص ضریب تبدیل غذایی، تیمار B (۲/۳۳) کمترین میزان را از خود نشان داد که نشان از وضعیت بهتر این تیمار بود. بعد از آن به ترتیب تیمارهای E، D، شاهد و C به ترتیب ۲/۵۹، ۲/۷۴، ۳/۲۵ و ۳/۴۷ قرار داشتند. هیچکدام از تیمارها تفاوت در سطح معنی‌دار از خود نشان نداد (P>۰/۰۵) (نمودار ۲). با توجه به P-Value ثبت شده از سویه‌های پروبیوتیک، تاثیر معنی‌داری از آن‌ها بر روند تغییرات این شاخص مشاهده نشد، گرچه اثر متقابل آنها تاثیری نزدیک به سطح معناداری از خود نشان داد (P=۰/۰۷۷) (جدول ۵).

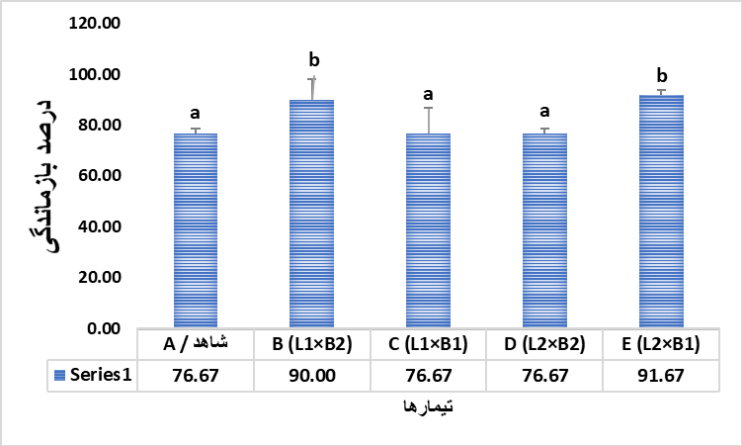


نمودار۲- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص ضریب تبدیل غذایی زیست توده میگوها در هر تیمار حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۵- میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده در شاخص ضریب تبدیل غذایی

	F	P-Value
باسیلوس سوبتیلیس	2/42	0/158
لاکتوباسیلوس پلانتارم	0/552	0/497
اثر متقابل هر دو سویه	4/116	0/077

درصد بازماندگی: بر اساس نتایج بدست آمده تیمارهای E و B به ترتیب با میزان ۹۱/۶۷ و ۹۱ درصد، بیشترین درصد بازماندگی را در سطح معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵). تیمارهای C و D با تیمار شاهد در یک سطح قرار داشتند (P>۰/۰۵) (نمودار ۳). با توجه به P-Value ثبت شده از سویه‌های پروبیوتیک، اثر متقابل آنها بر روند تغییرات ثبت شده در این شاخص مشهود بود (P=۰/۰۰۸) (جدول ۶).

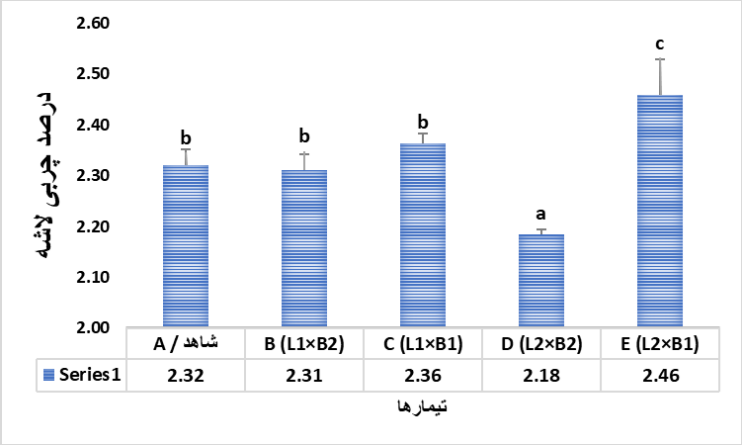


نمودار ۳- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص درصد بازماندگی زیست توده میگوها در هر تیمار حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۶- میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده در شاخص درصد بازماندگی

	F	P-Value
باسیلوس سوبتیلیس	0/042	0/843
لاکتوباسیلوس پلانتارم	0/042	0/843
اثر متقابل هر دو سویه	12/042	0/008

درصد چربی لاشه: طبق نتایج، تیمار E بیشترین افزایش را نسبت به شاهد در سطح معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). تیمارهای C و B نسبت به شاهد در یک سطح بودند (P>۰/۰۵). تیمار D نیز در سطح معنی داری از مابقی تیمارها کمتر بود (P>۰/۰۵) (نمودار ۴). تیمار بر اساس نتیجه P-value پروبیوتیک باسیلوس به صورت تک سوش در ایجاد تفاوت نقش دا شت (P=۰/۰)، علاوه بر آن پروبیوتیک‌ها به صورت متقابل نیز اثر داشتند (P=۰/۰۰۲) (جدول ۷).



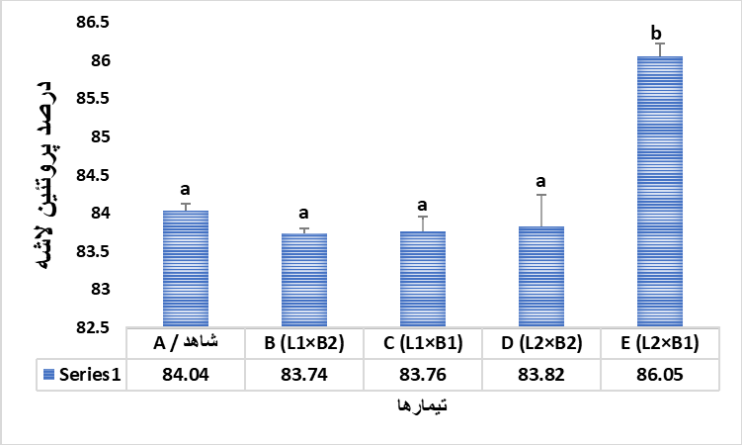
نمودار ۴- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص درصد چربی لاشه (٪) میگوها در هر تیمار
حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۷- میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده درصد چربی (٪) لاشه میگوها در هر تیمار.

	F	P-Value
باسیلوس سوبتیلیس	40.556	0
لاکتوباسیلوس پلانتارم	0.552	0.491
اثر متقابل هر دو سویه	19.349	0.002

درصد پروتئین لاشه: با توجه به نتایج، تیمار E بیشترین افزایش را در سطح معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵)، مابقی تیمارها در سطح غیر معنی‌داری از شاهد کمتر بودند (P>۰/۰۵) (نمودار ۵). اما با مشاهده نتیجه P-value پروبیوتیک‌ها اثر شدید آنها چه به صورت منفرد و چه به صورت ترکیب با یکدیگر بر این شاخص مشاهده شد، (P=۰/۰) (جدول۸).

در صد آبچک (Drip lost): طبق نتایج بد ست آمده از درصد آبچک (جدول ۹) تیمارها در روز ۱ اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان دادند که تیمارهای A، C، D و E با یکدیگر در یک سطح بوده (P>۰/۰۵) و با تیمار B اختلاف معنی‌داری دا شتند (P<۰/۰۵)، با مشاهده نتیجه P-value پروبیوتیک‌ها سویه باسلوس‌سوبتیلیس به صورت منفرد (P=۰/۰۳۲) و همچنین در ترکیب با لاکتوباسیلوس‌پلانتارم (P=۰/۰۰۸) در روز اول بر روی این شاخص تاثیر داشته. در روزهای ۱۵ و ۳۰ اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده نشد و بررسی تاثیر پروبیوتیک‌ها نیز نشان داد در این روزها که تاثیری بر روی آبچک نمونه‌ها ندا شتند. در روز ۴۵ نمونها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) که طبق نتیجه P-value سویه با سیلوس سوبتیلیس در ایجاد تفاوت موثر بوده (P=۰/۰۱۲). در روز ۶۰ نیز نمونه B با دیگر نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری داشته (P<۰/۰۵)که تاثیر با سیلوس سوبتیلیس (P=۰/۰۰۴) بر روی آن مشهود بود، تاثیر لاکتوبا سیلوس‌پلانتارم به صورت منفرد (P=۰/۰۷۱) و در ترکیب با باسیلوس سوبتیلیس (P=۰/۰۹۵) نیز نزدیک به سطح معناداری بود. تیمار B، در روز ۱ و روز ۶۰ میزان آبچک بالاتری نسبت به مابقی تیمارها داشت.



نمودار ۵- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص درصد پروتئین لاشه (٪) میگوها در هر تیمار
حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۸- میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده درصد پروتئین (٪) لاشه میگوها در هر تیمار

	F	P-Value
باسیلوس سوبتیلیس	61/018	0
لاکتوباسیلوس پلانتارم	67/701	0
اثر متقابل هر دو سویه	58/868	0

جدول ۹- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص درصد آبچک (٪) میگوها در هر تیمار به همراه میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده
حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

درصد آبچک								
اثر سویه‌ها			تیمارها					
اثر متقابل	لاکتوباسیلوس پلانتارم	باسیلوس سوبتیلیس	E L2×B1	D L2×B2	C L1×B1	B L1×B2	A control	روز
P =0/008	P =0/032	P =0/113	$4/7\pm0/7^{a}$	$4/02\pm0/6^{a}$	$4/3\pm0/5^{a}$	$6/6\pm0/9^{b}$	$4/5\pm0/4^{a}$	**1**
P =0/688	P =0/083	P =0/484	$4/2\pm0/4^{f}$	$4/1\pm0/1^{f}$	$5/4\pm0/5^{f}$	$4/8\pm1/4^{f}$	$5/2\pm0/5^{f}$	**15**
P =0/836	P =0/841	P =0/286	$5/3\pm1/3^{j}$	$6/2\pm0/5^{j}$	$5/6\pm0/5^{j}$	$6/2\pm1/6^{j}$	$5/1\pm1/2^{j}$	**30**
P =0/122	P =0/697	P =0/012	$4/9\pm0/6^{op}$	$5/5\pm0/7^{opq}$	$4/3\pm0/3^{o}$	$6/3\pm0/9^{oq}$	$6\pm0/6^{pq}$	**45**
P =0/095	P =0/071	P =0/004	$4/7\pm0/4^{t}$	$5/6\pm1/2^{t}$	$4/8\pm0/4^{t}$	$7/3\pm0/4^{u}$	$5/7\pm0/5^{t}$	**60**

ظرفیت نگهداری آب (WHC): طبق داده‌های درصد ظرفیت نگهداری آب در روز ۱ بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد($P<0,05$)، که سویه لاکتوباسیلوس‌پلانتارم به صورت منفرد ($P=0/037$) و ترکیب با باسیلوس‌سوبتیلیس ($P=0/004$) در روز ۱ بر روی این شاخص تاثیرگذار بود. در روز ۱۵، ۳۰ و ۴۵ بین نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در روز ۶۰ نمونه‌های A و B با یکدیگر و C و D با یکدیگر در یک سطح بودند ($P>0/05$) و نمونه E تفاوت معنی دار با A داشت($P<0/05$). سویه‌های پروبیوتیک نیز به صورت ترکیب با یکدیگر موثر نبودند گرچه تاثیر با سیلوس سوبتیلس ($P=0/073$) و لاکتوبا سیلوس‌پلانتارم

(P=۰/۰۷۴) به صورت منفرد نزدیک به سطح معناداری بودند (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص درصد ظرفیت نگهداری آب (٪) میگوها در هر تیمار به همراه میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده، حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

ظرفیت نگهداری آب								
اثر سویه‌ها			تیمارها					
اثر متقابل	لاکتوباسیلوس پلانتارم	باسیلوس سوبتیلیس	E L2×B1	D L2×B2	C L1×B1	B L1×B2	A control	روز
P =0/004	P =0/03	P =0/2	24/3±1/3^{a}	31/6±0/9^{bc}	33/4±1^{c}	29/5±4/5^{bc}	27/3±3/4^{ab}	**1**
P =0/5	P =0/5	P =0/09	37/3±6/1^{f}	42/9±6^{f}	31±4/6^{f}	42/7±12^{f}	43/7±4/9^{f}	**15**
P =0/2	P =0/6	P =0/8	37/8±7/3^{j}	40/7±2^{j}	40/2±0/3^{j}	36/1±5^{j}	39/2±8/9^{j}	**30**
P =0/7	P =0/129	P =0/18	44/9±4/3^{o}	41/13±2/2^{o}	40/35±5/05^{o}	33/87±9/7^{o}	38/5±8/11^{o}	**45**
P =0/9	P =0/074	P =0/07	31/9±7/8^{u}	25/4±4/6^{tu}	25/4±2/3^{tu}	19/5±4/5^{t}	18/1±4/8^{t}	**60**

pH: با توجه به نتایج اندازه‌گیری pH لاشه (جدول ۱۱) در روزهای معین شده، در روز ۱ اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). تاثیر سویه‌ها نیز به صورت منفرد و ترکیبی در سطح معناداری نبود. در روز ۱۵ تفاوت معناداری بین نمونه‌های A و C مشاهده شد (P<۰/۰۵)، تاثیر سویه‌های مورد استفاده در ایجاد این تفاوت معنی‌دار نقشی نداشت. در روز ۳۰ بین نمونه A و C تفاوت معنادار (P<۰/۰۵) مشاهده شد که تاثیر پروبیوتیک‌ها در این روز معنادار نبود. در روز ۴۵ نمونه C با دیگر نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار (P<۰,۰۵) داشت، تاثیر سویه‌های پروبیوتیک نیز به صورت ترکیب با یکدیگر معنادار (P=۰/۰۳۶) بود. در روز ۶۰ نیز نمونه D با دیگر نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشت که تاثیر سویه‌ها در این روز در سطح معناداری نبود (P>۰/۰۵). میزان pH تمامی تیمارهای تحت تاثیر پروبیوتیک در تمامی روزها اندکی بیشتر از نمونه شاهد بود.

جدول ۱۱- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص pH میگوها در هر تیمار به همراه میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

pH								
اثر سویه‌ها			تیمارها					
اثر متقابل	لاکتوباسیلوس پلانتارم	باسیلوس سوبتیلیس	E L2×B1	D L2×B2	C L1×B1	B L1×B2	A control	روز
P =0/6	P =0/4	P =0/2	6/8±0/09^{a}	6/75±0/2^{a}	6.9±0/09^{a}	6/8±0/4^{a}	6/7±0/1^{a}	**1**
P =0/1	P =0/3	P =0/1	6/9±0/08^{fg}	6/9±0/1^{fg}	7.1±0/1^{g}	6/9±0/07^{fg}	6/8±0/1^{f}	**15**
P =0/09	P =0/8	P =0/1	7/1±0/1^{jk}	7/1±0/1^{jk}	7.2±0/06^{k}	7 ±0/08^{jk}	6/9±0/1^{j}	**30**
P =0/03	P =0/1	P =0/1	7/1±0/01^{o}	7/1±0/06^{o}	7.3±0/0^{p}	7/1±0/1^{o}	7±0/07^{o}	**45**
P =0/1	P =0/1	P =0/2	7/2±0/03^{t}	7/3±0/1^{u}	7.4±0/03^{tu}	7/2±0/1^{t}	7/1±0/06^{t}	**60**

تیوباربیوتیک اسید (TBA): در خصوص تغییرات تیوباربیوتیک اسید (جدول ۱۲) در روز ۱ تفاوت معناداری بین نمونه‌ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵). در روز ۱۵ بین نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) که

بالاترین میزان مربوط به نمونه شـــاهد بود. در روز ۳۰ نمونـه‌هـای A و E بـا یکـدیگر تفـاوت معنـادار داشتند($P<۰/۰۵$) و مابقی نمونه‌ها با آن ۲ در یک سطح بودند ($P>۰/۰۵$). در روز ۴۵ و ۶۰ نیز تفاوت معناداری بین نمونه‌ها مشـــاهده نشـــد($P>۰/۰۵$). ســـویه‌های پروبیوتیک هم فقط در روز ۱۵رآن هم . در روز ۱ بالترین میزان مربوط به نمونه B بود. در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ بالاترین میزان مربوط به نمونه شـــاهد بود. در روز ۶۰ بالاترین میزان مربوط به نمونه E بود.

جدول ۱۲- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص تیوباربیوتیک اسید (میلی‌گرم مالون دی آلدئید/کیلوگرم) میگوها در هر تیمار به همراه میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده، حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد.

تیوباربیوتیک اسید								
تیمارها							اثر سویه‌ها	
روز	A control	B L1×B2	C L1×B1	D L2×B2	E L2×B1	باسیلوس سوبتیلیس	لاکتوباسیلوس پلانتارم	اثر متقابل
1	0/01±0/005^{a}	0/02±0/01^{a}	0/01±0/005^{a}	0/01±0/005^{a}	0/01±0/005^{a}	P =0/2	P =0/6	P =0/6
15	0/05±0/0^{h}	0/02±0/005^{fg}	0/02±0/005^{g}	0/01±0/005^{f}	0/02±0/0^{fg}	P =0/2	P =0/05	P =1
30	0/06±0/01^{k}	0/04±0/005^{jk}	0/04±0/1^{jk}	0/05±0/0^{jk}	0/04±0/005^{j}	P =0/4	P =1	P =0/4
45	0/08±0/005^{o}	0/06±0/01^{o}	0/06±0/01^{o}	0/06±0/01^{o}	0/07±0/005^{o}	P =0/3	P =0/3	P =0/3
60	0/2±0/5^{t}	0/1±0/3^{t}	0/1±0/07^{t}	0/1±0/04^{t}	0/2±0/09^{t}	P =0/1	P =0/3	P =0/3

نیتروژن فرار (TVB-N) : در خصوص شاخص نیتروژن فرار (جدول ۱۳) نیز در هیچکدام روزها نمونه‌ها با یکدیگر تفاوت معنادار ندا شتند ($P>۰/۰۵$). سویه‌های پروبیوتیک نیز تاثیرمعناداری بر روی این شاخص نشان ندادند.

جدول ۱۳- تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) در شاخص نیتروژن فرار (میلی‌گرم نیتروژن/۱۰۰گرم) میگوها در هر تیمار به همراه میزان P-Value سویه‌های مورد استفاده.

نیتروژن فرار								
تیمارها							اثر سویه‌ها	
روز	A control	B L1×B2	C L1×B1	D L2×B2	E L2×B1	باسیلوس سوبتیلیس	لاکتوباسیلوس پلانتارم	اثر متقابل
1	16/3±0/8^{a}	15/8±0/8^{a}	12/1±5/6^{a}	16/3±1/6^{a}	15/4±1/4^{a}	P =0/2	P =0/3	P =0/4
15	20±0/8^{f}	20/5±2/1^{f}	22/4±1/4^{f}	22/4±1/4^{f}	21/9±2/1^{f}	P =0/5	P =0/5	P =0/2
30	20/5±0/8^{j}	19/1±0/8^{j}	20/5±1/6^{j}	20±0/8^{j}	19/1±4/9^{j}	P =0/8	P =0/8	P =0/4
45	21/9±0/8^{o}	21/4±0/8^{o}	20/5±0/8^{o}	21/9±1/6^{o}	21±1/4^{o}	P =0/2	P =0/5	P =1
60	27/5±0/8^{t}	27 ±0./8^{t}	26/1±0/8^{t}	27/5±1/6^{t}	26/6±1/4^{t}	P =0/2	P =0/5	P =1

۳. بحث

از اثرات مفید پروبیوتیک ها می‌توان به عنوان منبع توزیع مواد مغذی و آنزیمی برای هضم ، فعال سازی دفاع ایمنی میزبان آنها و مهار میکروب‌های بیماری زا اشاره کرد (Wang *et al.*, 2007). ضیایی نژاد و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که هیچ تفاوتی در رشد و بازماندگی میگوهای سفید هندی (*Fenneropenaeus indus*) در مراحل پست لارو ۱ تا ۱۴ هنگامی که پروبیوتیک‌ها به طور مستقیم به آب پرورش افزوده می‌شوند یا از طریق آرتمیا غنی شده اضافه شدند وجود ندارد، نتیجه مشابه در تحقیق نیمرات و همکاران (۲۰۱۱) نیز مشاهده شد. باسیلوس در روده آنزیم‌هایی را که در هضم یا جذب مواد اساسی دخیل هستند را تولید یا ترشح آنها را تحریک می‌کند (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). تاپلور و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتارم، میزان بقا، پروتئاز و آمیلاز را در مقایسه با تیمارهای بدون پروبیوتیک افزایش می‌دهد. نتایج مطالعه اخیر در خصوص بهبود فاکتورهای رشد و بازماندگی در برخی تیمارهایی که تحت تاثیر ترکیبی از پروبیوتیک‌های باسیلوس سوبتیلیس و لاکتوباسلوس پلانتارم قرار گرفته‌اند با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد.

تغییرات ترکیبات بافت عضله میگو بستگی به فصل، سن، زمان بلوغ، جنسیت و دسترسی به غذا دارد (Karakoltsidis *et al.*, 1995). ترکیب شیمیایی آبزیان از گونه به گونه و حتی در میان یک گونه یکسان به صورت انفرادی میتواند متفاوت باشد. این اختلافات فردی در رابطه با عوامل متعددی مثل جنسیت، دوره تولید مثل، زمان صید، دسترسی غذایی و غیره می‌باشد (Ackman, 1989). در مطالعه‌ای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتارم باعث افزایش درصد چربی و پروتئین لاشه شاه‌میگوی آب شیرین شد (Nedaei *et al.*, 2018). در مطالعه اخیر میزان چربی لاشه بین ۲/۱۸-۲/۴۶ بسته به تیمارها متغیر بود پروتئین لاشه نیز بین ۸۳/۷۶_۸۶/۰۵ در صد بدست آمد که مقادیر ذکر شده می‌تواند تحت تاثیر کیفیت غذای مصرفی، شرایط مطلوب فیزیکوشیمیایی آب و تاثیر پروبیوتیک‌های مورد استفاده باشد. مهمترین تغییرات کیفیت طی نگهداری میگوی منجمد، از دست دادن رنگ، اکسید اسیون چربی، دناتوره شدن پروتئین، تصعید و دوباره کریستاله شدن یخ می باشد. این تغییرات می‌توانند منجر به از دست دادن طعم، تند شدن، دهیدراتاسیون، از دست دادن وزن، تغییرات بافتی، افزایش ازت فرار و کاهش ظرفیت نگهداری آب، همچنین فساد میکروبی و اتولیز شوند (Soncin *et al.*, 2009).

آبچک در نمونه‌های منجمد یک فرایند پیچیده است که می‌تواند به دلیل تجمع میوزین در طی نگهداری انجمادی باشد و در نتیجه باعث سفت شدن بافت و کاهش ظرفیت نگهداری آب شود (Mackie, 1993). باهود و همکاران (۲۰۰۸) مقدار زیادی از شکست‌های میوفیبر در فیله‌های سالمون آتالنتیک فوق سرد (۴۵ دقیقه در یک تونل فوق سرد در ۲۵-درجه سانتیگراد تا دمای مرکز به ۶/۵ -درجه سانتیگراد برسد) را به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ مشاهده کردند که همچنین باعث کاهش ظرفیت نگهداری آب شد. در صد آبچک با افزایش زمان نگهداری در سردخانه رابطه مستقیم دارد و این افزایش در نمونه‌های با انجماد کند بیشتر از انجماد سریع می‌باشد (Karami *et al.*, 2013). مطالعات زیادی انجام شده است که نشان دهنده افزایش آبچک و کاهش وزن ماهی بعد از انجمادزدایی بوده (Chevalier *et al.*, 2000; Makari *et al.*, 2007). در مطالعه اخیر میزان آبچک نمونه‌ها با گذشت زمان و افزایش مدت زمان نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس افزایش را نشان داد، گرچه در برخی تیمارها در نوساناتی وجود داشت اما در انتهای دوره آزمایش عدد ذکر شده برای آبچک بالاتر از روز اول بود. ظرفیت نگهداری آب هم مطابق با مطالعات قبلی با آبچک رابطه معکوس داشته و در انتهای دوره آزمایش کمتر از روز اول بود. به طور کلی تیمار B بیشترین در صد آبچک را داشت. افزایش pH در طول نگهداری در سردخانه به دلیل تولید آمین‌های فرار در طول فرآیند فساد است

(Fonseka *et al.*, 1993). در بررسی خود به منظور تعیین عمر نگهداری میگوی ببری پرورشی اعلام نمودند که در طول بررسی pH نمونه‌ها از ۶/۷ به ۷/۲ افزایش یافته است. شعبان و همکاران (۱۹۸۷) تغییرات کیفی بوجود آمده در میگوی ژاپنی (*P. japonicus*) نگهداری شده در شرایط مختلف را مورد بررسی قرار دادند و ادعا کردند که طی یک هفته نگهداری در یخ، pH گوشت میگو با سرعت زیادی از ۷ به ۷/۹ افزایش داشته است. سمیدو و همکاران ۱۹۹۷ بیان داشتند که علت پایین بودن pH در ابتدا بدلیل تولید اسید لاکتیک می‌باشد، در حالیکه افزایش pH در پایان دوره نگهداری در سردخانه به دلیل تولید ترکیبات بافری می‌باشد که ناشی از تخریب آنزیمی محتویات گوشت است. به طور کلی طبق یافته‌های بالا می‌توان ۷/۹ را به عنوان مرزی از حد قابل قبول pH در نظر گرفت. در مطالعه اخیر pH نمونه‌ها با گذشت زمان افزایش داشت که میزان ابتدایی و انتهایی pH نمونه‌هایی که تحت تاثیر پروبیوتیک قرار گرفتند نسبت به نمونه شاهد بالاتر بود و تاثیر جزئی را شاهد بودیم. در مطالعه اخیر pH هیچکدام از نمونه‌ها در پایان ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سلسیوس به ۷/۹ نرسید.

آزمایش تیوباربیتوریک اسید برای سنجش ترکیبات کربونیلی که در مرحله اکسیداسیون ثانویه چربی تشکیل می شوند مورد استفاده قرار میگیرد. تیوباربیتوریک اسید یک روش اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید میباشد، که در پایان تولید اکسیداسیون بوجود می‌آید. تیوباربیتوریک اسید ممکن است میزان اکسیداسیون واقعی لیپید را مشخص نکند. چرا که پایین بودن مالون‌دی‌آلدئید شاید ناشی از فعل و انفعال میان مالون‌دی‌آلدئید و آمینها، نوکلئوزیدها و اسیدنوکلئیک، آمینواسیدهای فسفولیپیدها، پروتئین‌ها یا دیگر آلدئیدها باشد که در پایان اکسیداسیون لیپید بوجود میآیند، که این فعل و انفعال بطور زیادی با گونه های مختلف آبزیان تغییر می‌کند (Regost *et al.*, 2004). در مواد با کیفیت بالا میزان TBA باید زیر ۳ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم را نشان دهد. مواد با کیفیت خوب نباید بیش از ۵ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم باشد و در مواد قابل مصرف ۷ تا ۸ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم قابل مصرف می باشد (Schormuller, 1965). کادون و همکاران (۲۰۰۵) اشاره کردند که مقادیر TBA کمتر از ۳ میلی گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم بیانگر شرایط قابل قبول برای غذاهای دریایی نگهداری شده به صورت منجمد می‌باشد. نتایج بدست آمده از TBA در مطالعه اخیر کیفیت خوب میگوها در پایان ۶۰ روز (حدود ۰/۲ میلی گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم در بالاترین مقدار ثبت شده) را نشان داد و روند افزایشی آن با توجه به ایجاد شدن مالون‌دی‌آلئید قابل توجیه است.

میزان ۲۸/۵ میلیگرم در ۱۰۰ گرم را به عنوان حد بالای TVB-N در میگوی نگهداری شده در یخ گزارش نمودند (Huidobro *et al.*, 2002). در تحقیق دیگری میگوی *Penaeus monodon* با میزان TVB-N ۳۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم به عنوان میگوی فاسد در نظر گرفته شد (Cadun *et al.*, 2005). در گزارش (Arashisar *et al.*, 2004) در جدول زمان نگهداری و میزان TVB-N ماهی قزل‌آلای نگهداری شده در یخ، در روند افزایشی این شاخص نوساناتی مشهود بود (کاهش در روز ششم و هشتم نگهداری). همچنین باکسیاس و همکارن (۲۰۰۳) نیز گزارش کردند که میزان TVB-N هیچ ارتباطی با زمان نگهداری ماهی هیک در یخ نداشت. به طور کلی در مطالعه اخیر TVB-N در طی زمان نگهداری، گرچه در انتهای دوره آزمایش بالاتر از ابتدای آن بود اما نوساناتی را نیز داشته است که با نتایج برخی از تحقیقات ذکر شده در بالا مطابقت دارد. به طور کلی طبق نتایج بدست آمده از بخش اول، استفاده همزمان از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتارم و باسیلوس سوبتیلیس در آب مخازن پرورش میگوی پاسفید غربی بر فاکتورهای رشد آن تأثیر مثبت دارد. با این حال فاکتورهای کیفی لاشه تاثیر خاصی از پروبیوتیک‌ها نپذیرفتند، گرچه در برخی موارد طبق نتایج تأثیر آنها مشاهده شد ولی به صورت کلی قابل اغماض بود. و روند تغییرات آنها بیشتر با نتایج قبلی نگهداری گوشت در شرایط انجماد منطبق بود.

References ۵. منابع

Ackman, R.G., 1989. Nutritional composition of fats in seafoods. *Progress in food & nutrition science* 13(3-4), 161-289.

Arashisar, Ş., Hisar, O., Kaya, M., Yanik, T., 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) fillets. *International journal of food microbiology* 97(2), 209-214.

Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Q., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R., Thomassen, M.S., 2008. Effects of −1.5 C super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chemistry* 111(2), 329-339.

Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2003. Suitability of volatile amines as freshness indexes for iced Mediterranean hake. *Journal of food Science* 68(5), 1607-1610.

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R., Phillips, M., 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP Publication* 10, 92-142.

Cadun, A., Cakli, S., Kisla, D.U., 2005. A study of marination of deep-water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris, Lucas*, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry* 90(1-2), 53-59.

Fonseka, T.S.G., Ranjini, I.V., 1993. Storage life of pond cultured shrimp (Penaeus monodon) held in melting ice and at ambient temperature. Applied Biology, 11, 63-71.

Hotel, A.C.P., Cordoba, A., 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Préservation* 5(1), 1-10.

Huidobro, A., López-Caballero, M., Mendes, R. 2002. Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: effect on quality. *European Food Research and Technology* 214(6), 469-475.

Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25(11), 633-642.

Karakoltsidis, P.A., Zotos, A., Constantinides, S.M. 1995. Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans, and molluscs. *Journal of Food composition and Analysis* 8(3), 258-273.

Karami, B., Moradi, Y., Motalebi, A.A., Hossini, S.E., Soltani, M., 2013. The effects of slow and quick freezing methods on microstructure, drip loss, proximate compositions and sensory properties of Nil Tilapia (*Oreochromis nilticus*) fillets. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 22, 132-146.

Kongnum, K., Hongpattarakere, T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with Vibrio harveyi. *Fish & Shellfish Immunology* 32(1), 170-177.

Mackie, I.M. 1993. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews International* 9(4), 575-610.

Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga, H., Kono, T., Itami, T., Sakai, M., 2014. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Marine Biotechnology* 16(2), 181-192.

Nedaei, S., Noori, A., Valipour, A., Khanipour, A.A., Hoseinifar, S.H., 2018. The effect of Lactobacillus plantarum on carcass composition, nutrient efficiency indices, growth performance and survival of Narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Journal of Aquatic Ecology* 8, 113-124.

Nimrat, S., Boonthai, T., Vuthiphandchai, V. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology* 169(3-4), 244-258.

Park, J.W. 2005. Surimi and Surimi Seafood. Second Edition. Academic press, 386 pp.

Pikul, J., Leszczynski, D.E., Kummerow, F.A., 1989. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37(5), 1309-1313.

Rawdkuen, S., Jongjareonrak, A., Phatcharat, S., Benjakul, S., 2010. Assessment of protein changes in farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscles during refrigerated storage. International journal of food science & technology 45(5), 985-994.

Regost, C., Jakobsen, J.V., Rørå, A.M.B., 2004. Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Research International* 37(3), 259-271.

Santos, E.E.M., Regenstein, J.M., 1990. Effects of vacuum packaging, glazing, and erythorbic acid on the shelf-life of frozen white hake and mackerel. *Journal of Food Science* 55(1), 64-70.

Schormüller, J. 1965. Handbuch der Lebensmittelchemie. Academic press, 243 pp.

Shaban, O., Ochiai, Y., Watabe, S., Hashimoto, K., 1987. Quality changes in Kuruma prawn (*Penaeus japonicas*) during frozen and ice storage. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 24(-), 18-23.

Simeonidou, S., Govaris, A., Vareltzis, K., 1997. Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International* 30(7), 479-484.

Soncin, S., Chiesa, L.M., Panseri, S., Biondi, P., Cantoni, C., 2009. Determination of volatile compounds of precooked prawn (*Penaeus vannamei*) and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice as possible spoilage markers using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(3), 436-442.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Abdullah, M.D.D., Bolong, A.M.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, 173-178.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4), 655-671.

Wang, M., Liu, G., Lu, M., Ke, X., Liu, Z., Gao, F., Yu, D., 2017. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. *Aquaculture Research* 48(6), 3163-3173.

Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269(1-4), 259-264.

Zhou, X.X., Wang, Y.B., Li, W.F., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287(3-4), 349-353.

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(2-4), 516-524.