



بررسی تلقیح مخلوط‌های سوسپانسیون باکتریایی لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و باسیلوس (*Bacillus*) تلقیح شده به آب سیستم پرورشی میگوی پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

و مطالعه‌ی شاخص‌های رشد و نرخ بقای آنها

مصطفی علی شیری 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 پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳

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 آبی 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 3×10^6 CFU/g (L_1) و 6×10^6 CFU/g (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 $61 \pm 3/41$ درصد، وزن خشک 1.43 ± 0.48 mg، همزمانی رسیدن لارو به پست‌لارو 1.26 ± 0.02 ، زمان پیدایش اولین پست لارو $7/5 \pm 0/82$ روز، طول دوره لاروی $8/4 \pm 0/15$ 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، $33/8$ درصد بهبود شاخص همزمانی رسیدن لارو به پست‌لارو، $14/7$ درصد کاهش زمان پیدایش اولین پست‌لارو و ۲۰ درصد 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 پاسبید غربی، شاخص LSI و LCI



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 Alishiri¹, Kamran Rezaei Tavabe², Gholamreza Rafiee³, 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 (B₁) and 6×10^5 (B₂) CFU/g from of bacterial suspension mixtures *Bacillus* probiotic and two concentrations of 3×10^6 (L₁) and 6×10^6 (L₂) CFU/g from of bacterial suspension mixtures probiotic *Lactobacillus* in combination includes: B₁L₁, B₁L₂, B₂L₁ and B₂L₂ 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

۱. مقدمه

تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر آزیان پرورشی بر جنبه‌های مختلفی نظیر بهبود پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط آبی پرورش، ارتقا عملکرد رشد و نمو آزیان پرورشی و نیز پیشگیری با عوامل بیماری‌زا در تحقیقات زیادی توسط محققان تایید شده است (Irianto and Austin, 2002). تغییر جمعیت میکروبی روده لاروهای آزیان با استفاده از باکتری‌ها انتخابی برای بهینه‌سازی آنها به منظور 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 می‌تواند در فرایند حذف رقابتی موجب حذف پاتوژن‌های باکتریایی بیماری‌زا شود (Narmatha et al., 2017). باکتری‌های باسیلوس نیز شامل باکتری‌هایی بزرگ، گرم مثبت و میله‌ای که اغلب هوازی اجباری یا بی‌هوازی 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 لاکتوباسیلوس پلانتروم (*Lactobacillus Plantarum*) بر روی میگوی پاسفید 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 و IGF 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 پاسفید غربی شد (Abdollahi-Arpanahi et al., 2018).

رشد و نمو همزمان لارو آزیان در یک دوره تکثیر و پرورش از اهمیت بالایی در مدیریت پرورش لاروی برخوردار است. از سویی دیگر آزیان دریایی در مراحل لاروی حساسیت بیشتری به استرس‌های محیطی دارند که این موضوع از دلایل مهم کاهش تولید در بسیاری از مزارع تکثیر و پرورش می‌باشد از اینرو مطالعه در زمینه همزمان‌سازی رشد و نمو و مقاوم‌سازی لارو آزیان 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 ۳ g 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 پاسفید غربی بر بهبود شاخص‌های

غلظت‌های مختلف هر دو پروبیوتیک انجام شد. در پیش آزمایش انجام شده غلظت استوک اصلی پروبیوتیک 6×10^{11} بود که با رقیق‌سازی سریالی به دوزهای موردنظر رسید. نتیجه پیش‌آزمایش با توجه به بیشترین بازماندگی نشان داد غلظت‌های 3×10^5 CFU/g (B1) و 6×10^5 (B2) برای پروبیوتیک باسیلوس و غلظت‌های 3×10^6 (L1) و 6×10^6 (L2) برای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس غلظت‌های بهینه می‌باشند. سپس این غلظت‌ها بصورت دو به دو با هم ترکیب و تاثیر مخلوط سوسپانسیون 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 باسیلوس و لاکتوباسیلوس در آب مخازن لاروی میگوی وانامی بود که به صورت روزانه به مخزن پرورش لارو همراه با تعویض روزانه ۱۰٪ آب اضافه شد و تاثیر آن بر تغییر شاخص‌های لاروی میگوی وانامی مورد سنجش قرار گرفت.

۲.۲.۳. شاخص‌های کیفی مورد بررسی مراحل

لاروی میگو پا سفید غربی

۲.۲.۳.۱. شاخص مرحله لاروی (LSI)^۱

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

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^۱ 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 ۲۰ L از جنس فایبرگلاس و با حجم ۱۰ L از آب فیلتر شده مورد استفاده در کارگاه تکثیر با شوری ۳۰ ppt، دمای ۳۰ °C آبگیری شدند.

۲.۱. تهیه لاروهای مورد نیاز

پس از تخم‌ریزی مولدین و در پی آن تفریح تخم‌ها و تبدیل شدن به ناپلیوس، با شمارش ناپلیوس‌ها به روش حجمی، با تراکم 1000 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 30000 cells/ml و از مرحله زوا ۲ با ناپلی آرتمیا با تراکم 15 nauplii/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 تعیین غلظت بهینه، یک پیش‌آزمایش با

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

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

$$LSI = \sum Si / N \quad \text{معادله (۱)}$$

Si = مرحله تکوین لاروی ($i=1$ تا 12)

N = تعداد لاروهای نمونه برداری شده

۲.۳.۲. شاخص وضعیت لاروی^۱ (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)

$$LCI = \sum P. (10N) - 1 \quad \text{معادله (۲)}$$

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 100°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 پست لارو (Ts)

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

$$T_s = T_{90} - T_{10} \quad \text{معادله (۳)}$$

T_{90} = مدت زمان که طول کشیده تا ۹۰ درصد لاروها به پست لارو تبدیل شوند

T_{10} = مدت زمانی که طول کشیده تا ۱۰ درصد لاروها به پست لارو تبدیل شوند

۲.۳.۶. زمان پیدایش اولین پست لارو

جهت محاسبه این شاخص، با توجه به بررسی مداوم در پایان مراحل لاروی (مایسیس ۲ و ۳)، پس از مشاهده اولین پست لاروها، مدت زمان پیدایش اولین پست لارو از زمان تفریح 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 پست لارو 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 کاملاً تصادفی بود که

^۱Larval Condition Index

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 معنی داری با کنترل می باشد. در روز ششم بین مخلوط های باکتریایی مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین در روز نهم لاروی نیز اختلاف معنی داری 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 معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

۳.۲. شاخص وضعیت لاروی (LCI)

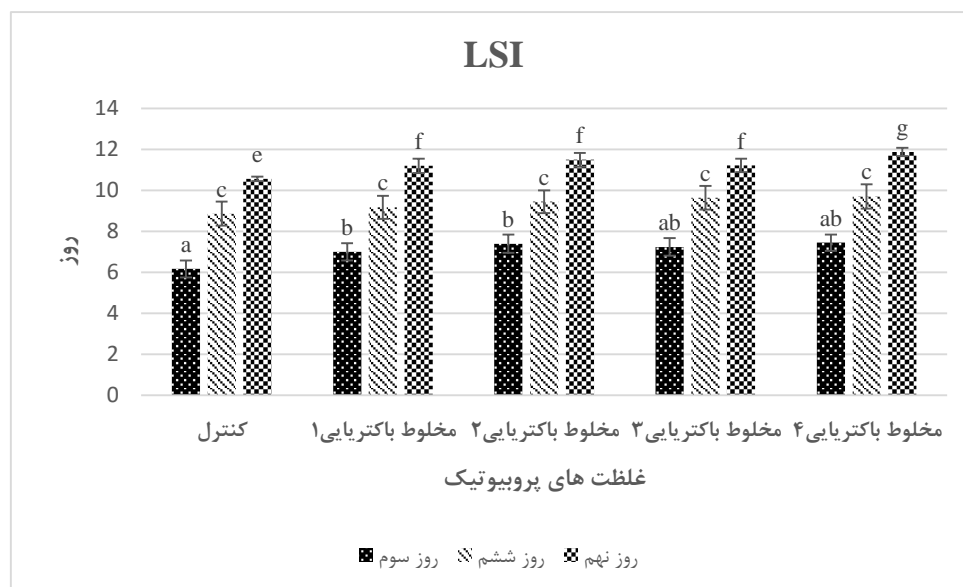
نتایج شاخص وضعیت لاروی طی روزهای سوم، ششم و نهم لاروی برای مخلوط های باکتریایی مورد آزمایش با گروه کنترل تماما دارای اختلاف معنی دار بود اما هیچگونه اختلاف معنی داری را بین مخلوط های باکتریایی مختلف پروبیوتیک در مخلوط های ۱ تا ۴ به جز روز نهم مخلوط باکتریایی ۴ نشان نداد. همچنین بیشترین مقدار LCI مربوط به مخلوط باکتریایی ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به مخلوط باکتریایی ۱ می باشد (نمودار ۲).

برای تجزیه و تحلیل داده های مربوطه از نرم افزار SPSS-22 و Excel-2016 استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسپیرنوف و بررسی همگنی واریانس ها در تیمارهای جداگانه با آزمون لون (Leven)، برای بررسی اختلاف معنی دار از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. لازم به ذکر است در کلیه نمودارها و جداول حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین هاست ($P < 0.05$). همچنین تمامی مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام گردید.

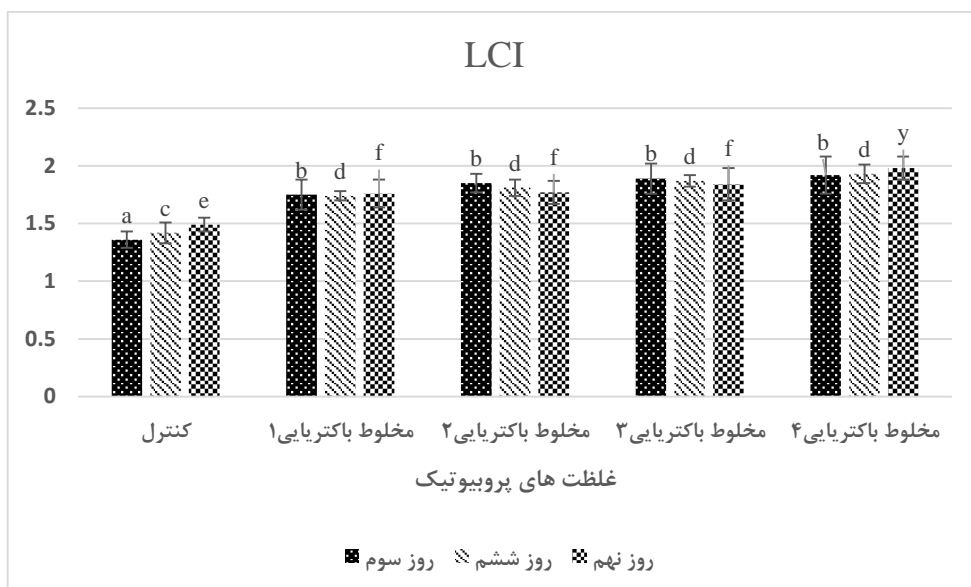
۳. نتایج

۳.۱. شاخص مرحله لاروی (LSI)

شاخص مرحله لاروی طی روزهای سوم، ششم و نهم لاروی برای هر تیمار اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده برای مخلوط های باکتریایی مختلف در روز سوم، ششم و



شکل ۱. نمودار میانگین شاخص مرحله لاروی برای مخلوط های باکتریایی بهینه مختلف پروبیوتیک های باسیلوس و لاکتوباسیلوس در روزهای متفاوت. حروف لاتین غیرمشترک در بالای ستون ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ($P < 0.05$) 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 ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح (P<۰/۰۵) است.

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 (جدول ۱). مشاهده گردید (۰,۰۴±۱,۲۵) روز).

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 (۰,۱۵±۸,۴) روز) مشاهده گردید (جدول ۱).

۳.۷. آزمایش‌های استرس شوری و فرمالین

میانگین درصد بقا لاروها در مرحله PL₁ با تست شوری ۱۰ ppt و فرمالین ۱۰۰ ppm در زمان ۶۰ دقیقه

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 تیمارهای 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 پست لارو (Ts)

شاخص همزمانی رسیدن لاروها به پست لارو (TS) بر

تفاوت معنی‌داری بین مخلوط باکتریایی ۱ تا ۴ مشاهده نگردید.

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

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 ($P < 0.05$)

شاخص‌ها	کنترل	مخلوط باکتریایی ۱	مخلوط باکتریایی ۲	مخلوط باکتریایی ۳	مخلوط باکتریایی 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±۰/۳ ^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 ($P < 0.05$).

تیماها	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 ۱۰ ppm	
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

قابلیت 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 توازن سسته به استقرار پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش آبزیان کمک کند مرحله رشدی آبی مورد نظر است، زیرا تاثیر گذاری این باکتری‌ها در مراحل لاروی به منظور شکل‌گیری و

به دیواره دستگاه گوارش برای جلوگیری از کلونیزه شدن عوامل بیماری‌زا، خنثی‌سازی سموم، فعالیت باکتریوسین‌ها و افزایش توانایی سیستم ایمنی بدن می‌باشد (Fernandez et al., 2011). همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تولید ترکیباتی مانند باکتریوسین‌ها، سیدروفورها، لیزوزیم‌ها، پروتئازها، هیدروژن پراکسیدها و جلوگیری از کلونی‌سازی باکتری‌های مضر در روده، رقابت جهت مصرف مواد مغذی و ارتقای سیستم ایمنی آبی به وسیله‌ی 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 پروبیوتیک‌ها 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 فاکتورهای 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 ترشح آن‌ها را تحریک می‌کنند (Ziaei-Nejad et al., 2006). در این راستا رئیسی و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقات خود دریافته‌اند که استفاده از مخلوط‌های باکتریایی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus Licheniformis* تاثیر بسزایی در قابلیت هضم اسید آمینه‌ها و در پی آن رشد داشته است که دلیل آن را به افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان

کلونی‌سازی در دستگاه گوارش بسیار آسان‌تر می‌باشد (Fuller, 1992). در همین راستا در پژوهشی با بررسی *Bacillus coagulans* بر میگوی وانامی از مرحله زوآ تا PL₈ در یافتند 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 آنزیم‌های 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 دی‌اکسید کربن 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 دریافته‌اند 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 با سیلوس و لاکتوبا سیلوس‌ها 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

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 احتمالاً ناشی از تاثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر میزان رشد لاروها می‌باشد. همچنین درصد بقا در آزمایش‌های تحت تنش‌های شوری و فرمالین بیانگر تاثیر مطلوب این باکتری‌های سودمند بر سیستم‌ایمنی لارو میگوی پاسبید 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 پست‌لاروها 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 و وضعیت لاروی، درصد 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.

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 $33 \mu\text{g}$ 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 بقا را 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 دوره ثبت شده است که هم با گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. افزایش میزان مقاومت 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

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 virology* 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 *Macrobrachium 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 in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential 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 *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on density and Digestibility of *Litopenaeus 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 (Binifit™) 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). *Aquaculture Research* 30, 917-922.
- Uno, Y., Kwon, C. 1969. Larval development of *Macrobrachium 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.