تأثیر دو نوع سین‌بیوتیک بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی شناختی همولنف میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

سعید ضیایی نژاد[1*]، عیسی شریف پور[2]
zbsaeed@yahoo.com

۱- دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۴

چکیده

از جمله راهکارهایی که می‌تواند علاوه بر تأمین مواد مغذی در جهت حمایت از رشد و نمو موجودات آبزی، سبب افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا شوند، استفاده از پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آبزیان می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی عملکرد دو سین‌بیوتیک تجاری و غیرتجاری بر شاخص‌های ایمنی‌شناختی و بیوشیمیایی همولنف میگوی سفید غربی در قالب ۴ تیمار آزمایشی S_1 (جیره حاوی سین‌بیوتیک تجاری)، S_2 (جیره حاوی سین‌بیوتیک غیرتجاری)، تیمار S_3 (جیره حاوی سین‌بیوتیک‌های تجاری و غیرتجاری به صورت توأم) و شاهد (C) (جیره فاقد سین‌بیوتیک) انجام پذیرفت. برای سین‌بیوتیک تجاری از مخلوط باکتری لاکتوباسیلوس تجاری (با غلظت $1/5\times10^{6}$ در گرم) و مانان الیگوساکارید (با غلظت ۱ درصد جیره) و برای سین‌بیوتیک غیرتجاری از مخلوط باکتری *Lactobacillus plantarum* (غیر تجاری) و مانان‌الیگوساکارید (با غلظت ۱ درصد جیره) استفاده گردید. پس از ۲ ماه غذادهی، برخی از شاخص‌های همولنف از جمله تعداد هموسیت کل و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی مانند گلوکز، پروتئین کل، فعالیت فاگوسیتوزی، فنولوکسیداز و آنتی اکسیدانی کل، سنجش شد. نتایج نشان داد که استفاده از این سین‌بیوتیک‌ها (هم تجاری و هم غیرتجاری) تعداد کل هموسیت‌ها را بطور معنی‌داری افزایش داد ($P<0/05$). بعلاوه میگوهای تغذیه شده در هر سه تیمار سین‌بیوتیکی دارای فاکتورهای بیوشیمیایی و شاخص‌های ایمنی بهتری نسبت به گروه کنترل بودند. در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود که استفاده از سین‌بیوتیک حاوی مانان‌الیگوساکارید و باکتری لاکتوباسیلوس بخصوص در صورت استفاده از *Lactobacillus plantarum* اثرات سودمندی بر شاخص‌های ایمنی میگوی سفید غربی دارد.

لغات کلیدی : سین‌بیوتیک، میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، مانان‌الیگوساکارید، لاکتوباسیلوس

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه گونه‌های متعددی از میگوها در سراسر دنیا پرورش داده می‌شوند. یکی از معروف ترین و عمده ترین این میگوها در سطح جهان، می‌گوی سفید غربی است که به طور گسترده ای در سطح دنیا پرورش داده می‌شود. از آنجا که این میگو یک گونه جدید در ایران می‌باشد، لذا می‌بایست کلیه جوانب امر در زمینه تکثیر و پرورش آن به دقت مورد بررسی قرار گیرد (خلیل پذیر و همکاران، ۱۳۸۶).

سین‌بیوتیک‌ها مفهوم جدیدی را برای آبزی پروری ارائه کرده اند. سین‌بیوتیک ترکیبی از پروبیوتیک و پری بیوتیک است که اثرات سودمندی برای میزبان به واسطه تحریک انتخابی رشد یک یا چند باکتری مفید دارد که منجر به بهبود بقاء و نهایتاً رفاه میزبان می‌گردد (Gibson & Raberfroid, 1995). Gibson و Raberfroid در سال ۱۹۹۵ اولین کسانی بودند که ایده پری بیوتیک‌ها را بیان داشتند. از بین کربوهیدرات‌ها، اکثرا الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم و بخصوص الیگوساکاریدهای حاوی فروکتوز به‌عنوان پری‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شوند (Ziemer & Gibson, 1998). با وجود مشخص شدن اثرات مفید پری‌بیوتیک‌ها در تحقیقات متعدد برای آبزیان، هنوز بسیاری از جنبه‌های افزودن پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها به جیره غذایی آبزیان مشخص نشده است. در خصوص استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری نیز مطالعات زیادی صورت گرفته است، از جمله اینکه Ziaei-nejad و همکاران (۲۰۰۵) از باسیلوس‌های پروبیوتیکی جهت افزایش کارایی آنزیم‌های گوارش میگوی سفید هندی استفاده نمودند. به دنبال آن، Vieira و همکاران (۲۰۰۷) از باکتری‌های اسید لاکتیک جهت افزایش بقاء میگوی ببری سیاه بعد از درگیری با ویبریوهارویی استفاده نمودند. در بررسی دیگری Keysami و همکاران (۲۰۱۲) از پروبیوتیک‌های *B. subtilis* جهت پرورش و تغذیه لارو میگوی دراز آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) استفاده نمودند که افزایش رشد و بقاء را شاهد بودند.

در خصوص تاثیر سین بیوتیک‌ها بر میگو، وشتانی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که افزودن سین بیوتیک حاوی پروبیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره میگوی سفید غربی به طور معنی داری باعث افزایش رشد، بهبود ضریب تبدیل غذا، افزایش بازماندگی و بهبود ترکیبات لاشه شد.

Nurhayati و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که تغذیه میگوی سفید غربی با سین‌بیوتیکی حاوی باکتری پروبیوتیکی *Vibrio.alginolyticus* و الیگوساکارید، علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد و بازماندگی، فعالیت فنولوکسیداز و تعداد کل هموسیت‌ها را افزایش داد. در همین راستا Munaei و همکاران (۲۰۱۴) و Arisa و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که سین‌بیوتیک مخلوط باکتری باسیلوس و مانان الیگوساکارید باعث افزایش ایمنی میگوی سفید غربی و مقاومت بیشتر در برابر بیماری ویبریوزیس شده است. بعلاوه در تحقیق دیگری تغذیه میگو با همین سین‌بیوتیک موجب افزایش تعداد کل هموسیت‌ها و فعالیت فنولوکسیداز شده است (Febrianti *et al*., 2016).

تاکنون در مورد مقایسه تأثیر سین‌بیوتیک تجاری و غیر تجاری جدا سازی شده، به عنوان پروبیوتیک بر روی میگوی سفید غربی در داخل ایران پژوهشی صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر سعی شده است که برای نخستین بار با اضافه کردن پروبیوتیک تجاری پریمالاک و پروبیوتیک غیر تجاری *Lactobacillus plantarum* به پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید، تاثیر سین‌بیوتیکی آنها در بهبود شاخص‌های ایمنی‌شناختی و بیوشیمیایی همولنف میگوی سفید غربی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی دوزهای باکتریایی

برای سویه تجاری از محصول پریمالاک (کشور آمریکا) حاوی *L.acidophilus* و *L. casei* با تراکم CFU/g $۱*۱۰^{۸}$ استفاده گردید. برای آماده سازی پروبیوتیک غیرتجاری از پروبیوتیک ایرانی خلیج فارس (تولید شرکت ارجان زیست‌یار) متشکل از *Lactobacillus plantarum* با تراکم CFU/g $۱*۱۰^{۸}$ استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس، که به‌صورت پودری و لیوفیلیزه(Lyophilized) بود، در آب مقطر

استریل حل شد. سپس روی محیط کشت MRS کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید. پس از آن با استفاده از محلول نیم مک فارلند و با استفاده از اسپکتروفتومتر بر اساس تعیین غلظت نوری (OD) و ارتباط آن با داده‌های رشد باکتری که قبلا به دست آمده است، میزان غلظت‌های مورد نظر با تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. با این روش تعداد باکتری‌های مورد نظر بر مبنای CFU/mL تعیین گردید. پس از تهیه دوز باکتریایی برای پروبیوتیک‌های تجاری غیر تجاری ($۱/۵\times۱۰^{۶}$) (Ziaei-nejad *et al.*, 2005)، که برای تیمارهای آزمایشی یکسان است، با مانان الیگوساکارید (شرکت Biorigin، برزیل) به میزان ۱ درصد جیره (Nurhayati *et al.*, 2015) مخلوط شده و سپس به غذای میگو افزوده شدند. بدین صورت که بعد از انجام محاسبات مقدار پروبیوتیک و پری‌بیوتیک مورد نظر در هر تیمار با مقداری آب مقطر استریل به غذای تجاری میگو (شرکت هووراش) مخلوط و به صورت خمیری در آورده می‌شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر استریل به تنهایی استفاده گردید. سپس با استفاده از چرخ گوشت دوباره به حالت پلت تبدیل شده و خشک می‌شدند. غذای تیمارهای مختلف به صورت روزانه تهیه می‌گردید و تا زمان استفاده در دمای ۳ درجه سانتیگراد نگه داری می‌شد. زیست‌پذیری باکتری‌ها در جیره غذایی بطور مرتب با نمونه گیری از غذاهای آماده شده و کشت آنها روی محیط کشت MRS مورد بررسی قرار می‌گرفت.

طرح آزمایش

این تحقیق در قالب چهار تیمار به صورت طرح کاملا تصادفی به ترتیب زیر اجرا گردید.

۱- تیمار شاهد (C) : پست‌لاروهایی که با جیره فاقد سین بیوتیک تغذیه شدند.

۲- تیمار S1: پست‌لاروهایی که با جیره‌ی مکمل شده با سین‌بیوتیک تجاری تغذیه شدند.

۳- تیمار S2: پست‌لاروهایی که با جیره‌ی مکمل شده با سین‌بیوتیک غیرتجاری تغذیه شدند.

۴- تیمار S3: پست‌لاروهایی که به جیره غذایی آن‌ها به صورت توأم سین‌بیوتیک غیرتجاری و تجاری افزوده شد.

میگوهای سفید غربی با وزن متوسط ۰/۲±۱ گرم در مخازن ۷۰ لیتری با تراکم ۵۰ قطعه (قائدنیا و همکاران، ۱۳۸۶) ذخیره سازی شدند. تغذیه بصورت روزانه، در ۳ نوبت و به میزان ۷ درصد وزن بدن صورت گرفت. تعویض آب روزانه ۲۰ درصد، هوادهی ثابت و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، برای مدت ۶۰ روز انجام گرفت. فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در طول مدت پرورش عبارت بود از: دمای آب ۱/۳۶±۲۹/۳۹ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۰/۳۲±۷/۳۱ میلیگرم در لیتر، شوری ۰/۶۵±۲۸/۰۰ گرم در لیتر و pH ۰/۰۸±۸/۱۶

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی‌شناختی همولنف

همولنف گیری: پس از ۲ ماه تغذیه، ۵ قطعه میگو بطور کاملا تصادفی از هر مخزن برداشت شد و جهت همولنف گیری مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه برداری از همولنف بر اساس روش خواجه و همکاران (۱۳۸۵) به وسیله سرنگ انسولین با سرسوزن شماره ۲۶ از طریق سینوس شکمی انجام گرفت. به عنوان ماده ضد انعقاد بر اساس روش فرهنگی و همکاران (۱۳۹۲) از ۰/۴ میلی لیتر محلول ضد انعقاد ***Alsever*** استفاده گردید. به منظور جداسازی سرم همولنف، نمونه‌ها در سرعت ۱۰ هزار دور به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند و تا زمان آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

شمارش سلول‌هاي همولنفي :برای شمارش سلول‌های همولنف و تعیین تعداد کل هموسیت‌ها (total haemocyte count, THC) و تعداد افتراقی هموسیت‌ها (differential haemocyte count, DHC) از لام هموسیتومتراستفاده شد. تعداد هموسیت کل همولنف به وسیله لام هموسیتومتر (نئوبار) و با بزرگ نمایی ۴۰ در زیر میکروسکوپ شمارش شد.

سنجش گلوکز: اندازه گیری میزان گلوکز در سرم به روش **Kunst** و همکاران (۱۹۸۳) و شفیعی‌ثابت و همکاران (۱۳۸۷) صورت پذیرفت. بدین منظور نمونه‌ها به روش فتومتریک در برابر بلانک با طول موج ۵۴۶ نانومتر قرار داده شد و ثبت گردید.

سنجش پروتئین کل: پروتئین کل نمونه‌ها بر اساس روش بیوره در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید (شفیعی‌ثابت و همکاران، ۱۳۸۷).

سنجش فعالیت فاگوسیتوزی: برای سنجش فعالیت فاگوسیتوزی از روش ***Rengpipat*** و همکاران (۲۰۰۰) استفاده گردید. بر این اساس همولنف جمع آوری (۰/۱ میلی لیتر) و با محلول ***KC-199*** (۰/۴ میلی لیتر) مخلوط گردید. هموسیت‌ها جدا گردید و با محلول ***K-199*** بوسیله سانتریفیوژ کردن با دور ***rpm*** ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد، شسته شدند. هموسیت‌ها با ۰/۱ میلی لیتر دانه لاتکس (قطر ذرات حدود ۱ میکرون) (شرکت ***Sigma***) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در یک اتاقک مرطوب در دمای اتاق نگه داری شد. سپس هموسیتها با گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد فیکس گردید. اسلایدها با محلول ***K-199*** شسته شدند و با رنگ ***Diff-Quick*** رنگ آمیزی گردیدند. سپس تعداد دانه‌های خورده شده و تعداد سلولهای فاگوسیتوزی با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش گردید. درصد فاگوسیتوزی، شاخص فاگوسیتیک و میانگین تعداد دانه‌های خورده شده در هر سلول بر اساس فرمولهای ذیل محاسبه گردید:

درصد فاگوسیتوزی= (تعداد سلولهای مشاهده شده/تعدا سلولهای خورنده دانه‌ها) * ۱۰۰

شاخص فاگوسیتیک = (تعداد سلولهای مشاهده شده/ تعداد سلولهای خورنده دانه‌ها) * (تعداد سلولهای مشاهده شده/ تعداد دانه‌های خورده شده)* ۱۰۰

سنجش فعالیت فنول اکسیداز: فعالیت فنول اکسیداز با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از ال-۳،۴-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (سیگما) به عنوان سوبسترا و تریپسین به عنوان محصول سنجیده شد (*Rengpipat et al., 2000*). ۲۰۰ مایکرولیتر از سوپرناتنت هموسیتی همولنف با افزودن ۲۰۰ مایکرولیتر ال-۳،۴-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (۰/۳ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با ۶۰۰ میکرولیتر بافر *CAC* رقیق و مخلوط گردید و تراکم نوری آن طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت افزایش ۰/۰۰۱ جذب در هر دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین (*۰/۰۰۱/min/mg protein*) تعریف گردید.

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی کل: برای اندازه گیری فعالیت اکسیدانی کل بر اساس روش ***Chien*** و همکاران (۲۰۰۳) از کیت آزمایشگاهی راندوکس (***Randox***) (انگلستان) استفاده گردید. برای این منظور نمونه‌های همولنف در طول موج ۶۰۰ نانومتر در ۳۷ درجه سانتیگراد بر اساس دستور العمل شرکت سازنده قرایت شد. فعالیت بر اساس واحد بین المللی آنزیم بیان گردید (IU^{-1}).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت پردازش نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسپیرنوف استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) انجام شده و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲) انجام شد.

نتایج

شاخص‌های همولنف

جدول ۱ نتایج مربوط به شمارش سلول‌های همولنف در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تعداد کل هموسیت‌ها در تیمارهای سین‌بیوتیکی نسبت به تیمار کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). این افزایش معنی دار در مورد سلولهای هیالین نیز مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). اما افزایش در خصوص هموسیت‌های نیمه دانه‌ای و هموسیت‌های دانه‌ای بزرگ معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). (جدول ۱)

جدول ۱ : نتیجه شمارش تعداد سلول‌های همولنف در تیمارهای مختلف (خطای استاندارد± میانگین)

شاخص‌های همولنف (×۱۰^۵ cell/ml)		S1	S2	S3	C
THC		۱۳۲/۳۷±۵/۵۴[a]	۱۳۶/۱۰±۸/۲۵[a]	۱۳۷/۱۶±۱۰/۶۳[a]	۱۱۷/۴۰±۶/۴۳[b]
DHC	HC[1]	۷۷/۶۶±۴/۱۳[a]	۸۰/۱۰±۳/۶۹[a]	۷۹/۱۲±۵/۲۹[a]	۷۰/۲۲±۴/۲۱[b]
	SGC[2]	۳۷/۴۹±۲/۸۵[a]	۳۸/۲۲±۲/۱۷[a]	۴۰/۱۶±۳/۸۶[a]	۳۳/۶۷±۵/۱۳[a]
	LGC[3]	۱۸/۳۲±۲/۶۹[a]	۱۸/۵۴±۳/۱۶[a]	۱۷/۷۵±۲/۴۷[a]	۱۵/۴۰±۲/۵۰[a]

**(حروف انگلیسی مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است)

۱- هیالین‌ها، Hyalin count ۲- هموسیت‌های نیمه دانه‌ای، Semi-Granular count ۳- هموسیت‌های دانه‌ای بزرگ، Large-Granular count

شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی شناختی همولنف:

شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌شناختی همولنف میگو در تیمارهای مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که هر چند میزان پروتئین کل همولنف در تیمارهای سین‌بیوتیکی نسبت به تیمار کنترل افزایش داشت، اما این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در خصوص میزان گلوکز همولنف نیز افزایشی در تیمارهای سین‌بیوتیکی مشاهده گردید، که این افزایش در تیمارهای S2 و S3 که از باکتری غیر تجاری استفاده نموده بودند نسبت به تیمار کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

نتایج نشان داد که شاخص‌های ایمنی در میگوهای تغذیه شده با سین‌بیوتیک‌های مختلف نسبت به گروه کنترل، افزایش داشتند (P<۰/۰۵). همانگونه که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد درصد فاگوسیتوزی، شاخص فاگوسیتیک، فعالیت فنولوکسیداز و فعالیت آنتی اکسیدانی در هر سه تیمار سین‌بیوتیکی بطور معنی‌داری بیشتر ازگروه کنترل است (P<۰/۰۵).

جدول ۲: میانگین پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی شناختی همولنف میگوها در تیمارهای مختلف (خطای استاندارد± میانگین)

تیمار	گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	پروتئین کل (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	درصد فاگوسیتوزی	شاخص فاگوسیتیک	فعالیت فنول اکسیداز (افزایش ۰/۰۰۱ جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین)	فعالیت آنتی اکسیدانی کل (واحد بین‌المللی)
S1	۱۸/۴۵±۱/۲۳[ab]	۱۰۲/۲۵±۳/۱۱[a]	۱۲/۰۴±۱/۶۵[a]	۷/۵۰±۱/۰۳[a]	۵۴۰/۲۸±۱۰/۴۸[a]	۱/۶۹±۰/۲۳[a]
S2	۱۹/۰۵±۱/۰۲[a]	۱۰۶/۶۳±۵/۱۰[a]	۱۲/۸۷±۰/۹۹[a]	۷/۵۷±۰/۹۴[a]	۵۳۷/۴۶±۱۲/۱۸[a]	۲/۰۶±۰/۷۵[a]
S3	۱۹/۱۵±۱/۸۱[a]	۱۰۴/۰۹±۳/۹۹[a]	۱۳/۱۵±۱/۹۶[a]	۸/۷۳±۰/۸۵[a]	۵۲۵/۷۵±۱۱/۸۲[a]	۱/۹۸±۰/۳۵[a]
C	۱۶/۷۴±۲/۰۳[b]	۹۷/۴۰±۴/۳۲[a]	۶/۸۱±۱/۰۰[b]	۲/۰۵±۰/۸۸[b]	۴۵۰/۲۳±۱۰/۰۲[b]	۱/۱۹±۰/۳۴[b]

**(حروف انگلیسی مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است)

بحث

در سالهای گذشته در خصوص استفاده از پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری و به خصوص پرورش میگو مطالعات زیادی صورت گرفته است (Ziaei-nejad *et al*., 2005 ؛ Munaei *et al*., 2014 ؛ Arisa *et al*., 2015). در مطالعه حاضر با اضافه کردن مکمل‌های غذایی سین‌بیوتیکی حاوی پروبیوتیک‌های تجاری و - غیر تجاری به اجزاء اصلی تشکیل دهنده جیره غذایی میگوی سفید غربی به نقش آنها در بهبود شاخص‌های همولنفی و ارتقاء ایمنی

پرداخته شد. آنچه از نتایج این تحقیق بر می‌آید این است که هم سین‌بیوتیک تجاری و هم سین‌بیوتیک غیر تجاری می‌توانند فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی‌شناختی همولنف میگوی سفید غربی را افزایش دهند (جداول ۱ و۲). هر چند شاید بتوان گفت که عملکرد سین‌بیوتیک غیرتجاری (تیمار S2) و سین‌بیوتیک مخلوط (تیمار S3) تاحدی بهتر از سین‌بیوتیک تجاری (تیمار S1) بوده است. دلیل استفاده از تیمار مخلوط در این تحقیق فرضیه هم‌افزایی اثرات مثبت چندین سویه پروبیوتیکی حاصل از پروبیوتیک تجاری و غیر تجاری در سیستم ایمنی میگو بود که با توجه به نتایج به خوبی به اثبات رسید.

همانگونه که بخش مقدمه نیز اشاره شد در خصوص تاثیر سین‌بیوتیک‌ها بر میگو، وشتانی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که افزودن سین بیوتیک حاوی پروبیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره میگوی سفید غربی به طور معنی داری باعث افزایش رشد، بهبود ضریب تبدیل غذا، افزایش بازماندگی و بهبود ترکیبات لاشه شد.

Nurhayati و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که تغذیه میگوی سفید غربی با سین‌بیوتیکی حاوی باکتری پروبیوتیکی *V.alginolyticus* و الیگوساکارید، علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد و بازماندگی، فعالیت فنولوکسیداز و تعداد کل هموسیت‌ها را افزایش داد. در همین راستا Munaei و همکاران (۲۰۱۴) و Arisa و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که سین‌بیوتیک مخلوط باکتری باسیلوس و مانان الیگوساکارید باعث افزایش ایمنی میگوی سفید غربی و مقاومت بیشتر در برابر بیماری ویبریوزیس شده است.

یکی از اجزاء سین‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، باکتری تجاری و بومی لاکتوباسیلوس بودند. در مطالعات مختلفی اثرات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌ها و تاثیرات مثبت آنها در پرورش آبزیان به اثبات رسیده است. Vieira و همکاران (۲۰۰۷) از باکتری‌های لاکتوباسیل جهت افزایش بقاء میگوی ببری سیاه بعد از مواجهه با *V.harvei* استفاده نمودند. در مورد ماهی نیز Carnevali و همکاران (۲۰۰۴) گزارش دادند که به دنبال استفاده از باکتری *Lactobacillus fructivorans* و *L. plantarum*، افزایش رشد و بازماندگی را در ماهی شانک مشاده کردند. Rengpipat و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان دادند که با استفاده از پروبیوتیک باکتریایی *Bacilus S11* تمام شاخص‌های ایمنی میگوی ببری سیاه (*P.monoden*) شامل هموسیت کل، فعالیت فاگوسیتوزی، فنولوکسیداز و فعالیت ضد باکتریایی افزایش می‌یابد و بطور خلاصه این باکتری هم دفاع ایمنی سلولی و هم دفاع ایمنی هومورال (humoral) را در میگو ایجاد می‌نماید.

در تحقیق حاضر با مقایسه تیمارهای سین‌بیوتیکی با یکدیگر، هر چند همه تیمارها اثرات مثبتی از خود نشان دادند، اما تفاوتهایی قابل مشاهده است که مسلما به تفاوت در سین‌بیوتیک‌ها یا بطور واضح‌تری تفاوت در سویه‌های باکتری‌های لاکتوباسیلی مورد استفاده بر می‌گردد.

همانگونه که در بخش نتایج نشان داده شد، سین‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این تحقیق تاثیر معنی‌داری بر تعداد سلولهای همولنف میگوی سفید غربی داشتند. تاثیر مثبت پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها بر تعداد هموسیت‌های همولنف سخت‌پوستان در چندین مطالعه به اثبات رسیده است. Hai و Fotedar (۲۰۰۹) نشان دادند که پری‌بیوتیک‌های β-1,3-D-glucan و Bio-Mos® و باکتری‌های پروبیوتیکی *Pseudomonas synxantha* و *P. aeruginosa*، تعداد هموسیت کل (THC) را در شاه میگوی جوان غربی افزایش می‌دهد. اوجی فرد و همکاران (۱۳۸۹) نیز نشان دادند که به دنبال تغذیه میگوی سفید غربی با پری‌بیوتیک اینولین، تعداد کل هموسیت‌های همولنف به میزان ۱۲/۲۶ درصد نسبت به تیمار کنترل افزایش یافت . این در حالی است که Febrianti و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که تحت تاثیر سین‌بیوتیکی حاوی باکتری باسیلوس و پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید، فاکتورهای ایمنی از جمله تعداد کل هموسیت‌ها و فعالیت فنولوکسیداز در میگوی سفید غربی افزایش یافت.. در سخت‌پوستان هموسیت‌های سیال نه فقط از طریق فاگوسیتوز و کشتن عوامل عفونی بلکه با سنتز و اگزوسیتوز ترکیبات ضد میکروبی، نقش مهمی در سیستم ایمنی میگو ایفا می‌کنند (Smith *et al.*, 2003). این مسئله شاید یکی از دلایلی باشد که در تحقیق حاضر در تیمارهای سین‌بیوتیکی به دنبال افزایش

هموسیت‌ها، فاکتورهای ایمنی و نیز فعالیت فاگوسیتوزی نیز افزایش یافته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمام میگوهای تغذیه شده با سین‌بیوتیک‌های مختلف دارای شاخص‌های ایمنی بیشتری نسبت به گروه کنترل هستند. همانگونه که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد درصد فاگوسیتوزی، شاخص فاگوسیتیک، فعالیت فنولوکسیداز و فعالیت آنتی اکسیدانی در هر سه تیمار سین‌بیوتیکی بطور معنی داری بیشتر از تیمار کنترل است.

آنچنانچه از مرور منابع مختلف استخراج می‌شود، یکی از مسیرهای عملکردی پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در آبزیان افزایش پاسخ‌های ایمنی است. این بهبود سیستم ایمنی در نهایت می‌تواند باعث کاهش مرگ و میر و افزایش بازماندگی میگو گردد. افزایش پاسخ‌های ایمنی به ویژه در سخت‌پوستانی همچون میگو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به اینکه میگوها دارای پاسخ ایمنی غیراختصاصی هستند (Anderson, 1992)، واکسیناسیون یا تحریک ایمنی ممکن است تنها باعث حفاظت کوتاه مدت آنها در برابر عوامل بیماری‌زای اختصاصی گردد (Sung & Sony, 1996 ؛ Sung *et al.*, 1996). از این‌رو ممکن است تیمارهای موثر پروبیوتیکی یا پری‌بیوتیکی، حفاظت غیر اختصاصی بیشتر و با طیف گسترده‌تری را هم به عنوان نتیجه افزایش ایمنی سرولوژیکی و هم حذف رقابتی در دستگاه گوارش میگوها فراهم نمایند (Rengpipat *et al.*, 2000). جالب توجه است که پروبیوتیک‌ها به علت استقرار در دستگاه گوارش در مقایسه با سایر ترکیبات محرک ایمنی مثل گلوکان‌ها باعث تحریک طولانی مدت‌تر سیستم ایمنی آبزیان می‌شوند.

در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود که استفاده از سین‌بیوتیک حاوی مانان‌الیگوساکارید و باکتری لاکتوباسیلوس بخصوص در صورت استفاده از *Lactobacillus plantarum* اثرات سودمندی بر شاخص‌های ایمنی میگوی سفید غربی دارد. نتایج این تحقیق بدون تردید به افزایش تولید و کاهش استفاده از مواد شیمیایی و داروها در آبزی‌پروری بخصوص در بخش میگو کمک خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان انجام پذیرفته است.

منابع:

اوجی فرد، ا.، عابدیان کناری، ع.، حسینی، ع. و یگانه، و.، ۱۳۸۹. تاثیر پربیوتیک اینولین جیره بر شاخص‌های رشد ترکیب شیمیایی عضله و برخی پارامترهای همولنف میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*). مجله شیلات، سال چهارم، شماره ۱.

خلیل پذیر، م.، متین فر، ع.، مهرابی، م. زرشناس، غ.، دشتیان نسب، ع. و غریبی، ق.، ۱۳۸۶. تاثیر پروبیوتیک باسیلوس (*Bacillus Spp.*) بر رشد و درصد بازماندگی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در شوری‌های ۳۰ و ۴۰ قسمت در هزار. فصلنامه علمی و پژوهشی دامپزشکی، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، ۵۱ صفحه.

خواجه، غ.، اکبری، س. و سلیمی فرد، ه.، ۱۳۸۵ .بررسی میزان برخی پارامترهای بیوشیمیایی همولنف میگوی پرورشی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*). پژوهش و سازندگی، دوره ۱۹، شماره ۴، ۱۲۰-۱۲۷.

شفیعی‌ثابت، س.، ایمانپور، م.، امینیان فتیده، ب. و گرگین، س.، ۱۳۸۷. مطالعه مقایسه ای برخی از شاخصهای یونی و متابولیکی خون در مولدین ماده ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال دوم، شماره ۳.

قائدنیا، ب.، قربانی، ر. و خلیل پذیر، م.، ۱۳۸۶. بررسی تراکم پذیری میگوی پاسفید (*Litopenaeus Vannamei*) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۶.

فرهنگی، م.، احمدی، س.، رفیعی، غ.، قاعدنیا، ب. و تقوی، د.، ۱۳۹۲. بررسی اثر سطوح مختلف رنگدانه

آستاگزانتین در جیره غذایی بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی میگوی جوان پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با تنش کاهش شدید اکسیژن. مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۳۲ ، شماره ۲، ۱۱۴-۱۰۳.

وشتانی، س.، عابدیان کناری، ع.، اکرمی،ر. و جیران، آ.، ۱۳۹۳. اثر جیره‌های حاوی سین بیوتیک(ترکیب پرو بیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک مانان الیگوساکارید) بر عملکرد رشد، بقاء و ترکیب لاشه میگوی جوان پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). نشریه توسعه آبزی پروری، سال هشتم، شماره ۳، صفحه ۹۳-۸۵.

Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture.Annu. Rev. Fish Dis. 2, 281–307.

Arisa, I., Widanarni W. Yuhana, M., Muchlisin, Z. and Muhammadar, A., 2015. The application of probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance the immune responses of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to Vibrio harveyi infection. AACL BIOFLUX. Volume 8, Issue 5. 772-778.

Carnevali, O., Zamponi, M., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano. M., Polzonetti, A. and Cresci, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aquaculture International. 12: 377-386.

Chien, Y., Pan, C. and Hunter, B., 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquaculture, 216, 177–191.

Febrianti, D., Yuhana M. and Widanarni W., 2016. Dietary Synbiotic Microcapsule Influence the Immune Responses, Growth Performance and Microbial Populations to White Spot Syndrome Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Journal of Fisheries and Aquatic Science Volume 11, Number 1, 28-42.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, Vol. 125, No. 6, pp. 1401–141.

Hai, N.V. and Fotedar, R., 2009. Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos® and β-1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus Kishinouye*, 1896). Aquaculture, 289: 310–316.

Keysami, M.A., Mohammadpour, M. and Saad, C.R., 2012. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) at different methods of administration to the feed. Aquaculture International, 20: 499-511.

Kunst, A., Draeger, B. and Ziegenhorm, J., 1983. UV- methods with hexoquinase and glucose- 6- phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U., Ed., Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 6, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, pp 163–185.

Munaei, W., Yuhana, M., and Widanarnin W.,. 2014. Effect of Micro-encapsulated Synbiotic at Different Frequencies for Luminous Vibriosis Control inWhite Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Microbiol Indones. Vol.8, No.2, June 2014, p 73-80.

Nurhayati, D., Widanarni, W., and Yuhana M., 2015. Dietary Synbiotic Influence on the Growth Performances and Immune Responses to Co-Infection with Infectious Myonecrosis Virus and Vibrio harveyi in *Litopenaeus vannamei* . Journal of Fisheries and Aquatic Science Vol. 10, No. 1, 13-23.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191,271-288.

Smith V.J., Brown J.H., and Hauton C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection; Fish and Shellfish immunology. 15: 71-90.

Sung, H.H. and Sony, Y.L., 1996. Tissue location of Vibrio antigen delivered by immersion to tiger shrimp *Penaeus monodon* . Aquaculture, 145, 41–54.

Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L., 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crust. Biol. 16, 278–284.

Vieira, F.N., PedrottiI, F.S., Buglione Neto, C.C., Pedreira Mourino, J.L., Beltrame, E., Martins, M.L., Ramirez,C. and Vinatea Arana, L.A., 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after infection with *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Oceanography, 55: 251-255.

Ziaei-Nejad, S., Habibi Rezaei, M., Azari Takami, G., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A. and Shakouri, M., 2005. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*), Aquaculture, 252: 516-524.

Ziemer, C. J. and Gibson, G. R., 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. International Dairy Journal, Vol. 8, No. 5-6, 473–479.

The effects of two synbiotics on biochemical and immunological parameters of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemolymph

Ziaeenezhad S.[1*]; Sharifpour I.[2]

[*]zbsaeed@yahoo.com

1-Department of Fisheries, College of Natural Resources, Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan
2- Iranian Fisheries Research Institute (IFRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)

Received: May 2015 Accepted: December 2015

Keywords: Synbiotic, Western white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Mannan oligosaccharide, *Lactobacillus* spp.

Abstract

The solution that can also provide nutrients to support the growth of aquatic organisms, increased health, resistance to stress and pathogens are using dietary probiotics, prebiotics and synbiotic in aquatic food. This study aimed to evaluate the performance of commercial and non-commercial synbiotic on hematologic and biochemical parameters of western white shrimp hemolymph was done in 4 treatments including S1 (commercial synbiotic), S2 (non-commercial synbiotic), treatment S3 (combination of commercial and non-commercial synbiotic) and control (C) (witout synbiotic). For commercial synbiotic, a mixture of a commercial *Lactobacillus* spp. bacteria (at a concentration of 1.5×10^6 per g) and mannan oligosaccharide (at a concentration of 1%), and for non-commercial synbiotic, a mixture of a non-commercial *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus plantarum)* and mannan oligosaccharide was used. After 2 months of feeding, some of hemolymph indexes such as the number of total haemocytes, and biochemical and immunological parameters such as glucose, total protein, phagocytosis, phenoloxidase and total antioxidant were measured. The results showed that application of the synbiotics (both commercial and non-commercial) could increase the total number of haemocyte significantly ($p<0.05$). Immunological indicators and biochemical factors in the shrimp fed with different synbiotics, were beter than the control group ($p<0.05$). According to the results can mention that application of the synbiotics including mananoligosaccharide and *Lactobacillus spp.* bacteria, specialy if *Lactobacillus plantarum* was used, has beneficial effects on Immunological indicators of white shrimp.

* Corresponding author