

## بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک‌های باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور

### میکروبی روده پست‌لارو میگوی پا سفید غربی

*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

داریوش عبدالله‌آرپناهی<sup>۱\*</sup>، حجت‌الله جعفریان<sup>۱</sup>، مهدی سلطانی<sup>۲</sup>، حسنی قلی‌پور کنعانی<sup>۱</sup>

\* dabdollahi8@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گند کاووس، گلستان، ایران  
۲- استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۲

#### چکیده

در مطالعه حاضر تأثیر مصرف جیره‌های حاوی *B. licheniformis* و *Bacillus subtilis* در سه قالب تجاری، تجاری-بومی و بومی بر روی برخی شاخص‌های ایمنی (گلوکز، آلبومین، پروتئین کل، لیزوژیم، کورتیزول، ایمونوگلوبولین M (IgM) و فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) ارزیابی شد. میگوها در طول دوره آزمایش (۶۰ روز) با چهار جیره مختلف تغذیه شدند: شاهد (بدون پروبیوتیک)، جیره T1 مکمل شده با  $1/5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> از پروبیوتیک تجاری، جیره T2 با  $1/5 \times 10^6$  CFU از پروبیوتیک تجاری-بومی، جیره T3 با  $1/5 \times 10^6$  CFU از پروبیوتیک بومی. در پایان دوره آزمایش، سطوح پارامترهای بیوشیمیایی (گلوکز، پروتئین کل، لیزوژیم، کورتیزول، IgM) در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک بطور معنی‌داری نسبت به میگوهای تغذیه شده با جیره شاهد بیشتر بود. با این وجود، اختلاف معنی‌داری در غلظت آلبومین بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشد، اما پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره‌های T2 و T3 (به ترتیب  $1/19$  و  $1/14$ ) مقدار آن افزایش یافت. همچنین تراکم جمعیت باکتری‌های باسیلوس شمارش شده در دستگاه گوارش میگوهای تغذیه شده با پروبیوتیک بطور معنی‌داری نسبت به شاهد بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک‌های باسیلی می‌تواند موجب بهبود پارامترهای ایمنی و تعدیل فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی سفید غربی گردد.

**واژگان کلیدی:** میگوی سفید غربی، پروبیوتیک، باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس لیچنی فورمیس، ایمنی

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

میدانی<sup>۴</sup> و به عنوان یک عامل میتوژنیک<sup>۵</sup> در شرایط آزمایشگاهی مستند شده است (Green *et al.*, 1999). چندین مقاله تحقیقاتی در مورد فواید استفاده از باسیلوس به منظور بهبود فاکتورهای ایمنی و فلور میکروبی روده در آبزی پروری منتشر شده است. Tseng و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که استفاده از پروپوتوکیک باسیلوس سابتیلیس در جیره غذایی میگویی پا سفید غربی موجب بهبود فاکتورهای ایمنی در این میگو می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تلقیح با سویه‌های باکتریایی در پرورش لارو میگویی پا سفید غربی (ناپلیوس مرحله V) مانع از تجمع<sup>۶</sup> سویه‌های بیماری‌زا می‌شود زیرا پروپوتوکیک‌ها با موفقیت در دستگاه گواراش لارو تجمع یافته‌اند (Gomez-Gil *et al.*, 2000). همچنین باسیلوس S11 اثرات مثبتی بر پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر باکتری فلورسنت ویبریو هاروی (Vibrio harveyi) در میگویی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) را نشان داد (Rengpipat *et al.*, 2000). در مورد تأثیر باکتری‌های باسیلوس تجاری و بومی به عنوان پروپوتوکیک بر روی شاخص‌های ایمنی میگویی پا سفید غربی در داخل کشور گزارشات علمی محدودی وجود دارد. لذا در مطالعه حاضر، اثرات باکتری‌های پروپوتوکیک باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور میکروبی میگویی پا سفید غربی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### پروپوتوکیک‌های باسیلوسی مورد استفاده

اسپور باسیلوس‌های پروپوتوکیک تجاری مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پروتکسین آکواتک<sup>۷</sup> تهیه گردید. این محصول تجاری بصورت سوسپانسیون باکتریایی (*Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis*) بود که از سوسپانسیون محصول فوق با استفاده از دستورالعمل شرکت پروتکسین، غلظت  $10 \times 1/5$  اسپور در هر میلی لیتر محیط فعال سازی به

صنعت پرورش میگو خطرات جدی را تجربه کرده است که در این میان، بیماری‌های میگو ناشی از باکتری‌های فرستطلبه همچون ویبریو (Liu *et al.*, 2004) و ویروس‌ها (Teng *et al.*, 2006) از مشکلات عمدۀ‌ای است که می‌تواند منجر به ضرر و زیان بزرگ اقتصادی شود.

سازوکار دفاعی در میگو بر خلاف مهره‌داران، فاقد ایمنی انطباقی<sup>۱</sup> است و کاملاً به ایمنی ذاتی یا طبیعی<sup>۲</sup> خویش وابسته است. بنابراین، محصولاتی همچون محرک‌های ایمنی و پروپوتوکیک‌ها که می‌توانند موجب افزایش ایمنی میزبان و مقاومت نسبت به بیماری شوند، در حال حاضر در پیشگیری از بیماری‌های میگو مورد استفاده می‌گردند و تمایل به استفاده از آن‌ها نیز در سال‌های اخیر افزایش یافته است (Sakai, 1999; Farzanfar, 2006). پروپوتوکیک‌ها باکتری‌های بی‌ضرری هستند که موجب تحریک سلامت جانور میزبان از طریق حضور مستقیم و یا حفاظت غیر مستقیم در برابر باکتری‌های مضر می‌شوند. اثرات مثبت استفاده از برخی باکتری‌های مفید در آبزی پروری به خوبی مستند شده است (Farzanfar, 2006; Decamp *et al.*, 2008) و درمان با پروپوتوکیک‌ها نیز به سرعت افزایش یافته است. Decamp *et al.*, (2008) سودمند بوده و به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های حیوانات پرورشی به حساب می‌آیند (Rengpipat *et al.*, 2000).

باسیلوس سابتیلیس یک باکتری سaproوفیت گرم مثبت، غیر بیماری‌زا بوده که اسپور آن به طور معمول در هوا، آب، گرد و غبار، خاک و رسوبات یافت می‌شود (Gatesoupe, 1999; Green *et al.*, 1999). اثرات درمانی باسیلوس سابتیلیس به عنوان عامل محرک ایمنی در انواع بیماری‌های انسان و حیوانات در شرایط آزمایشگاهی<sup>۳</sup>، تحریک ترشح ایمونوگلوبولین A در شرایط

<sup>4</sup> In vivo

<sup>5</sup> mitogenic

<sup>6</sup> colonization

<sup>7</sup> Protexin Aquatech. UK.

<sup>1</sup> Adaptive immunity

<sup>2</sup> innate immunity

<sup>3</sup> In vitro

دماهی آب ۲۸-۳۲ سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۶/۱-۶/۷ میلی‌گرم در لیتر، شوری ۳۸-۴۲ قسمت در هزار و pH آب ۸/۳-۸/۵ در نوسان بود. غذای بکار رفته ساخت شرکت هوورراش و حاوی ۳۸ درصد پروتئین، ۹ درصد چربی و سطح انرژی برابر با ۴۵۲۳ کالری بر گرم بود. میگوها با یکی از چهار جیره غذایی (شاهد، جیره T1، T2 و T3) تغذیه شدند. نرخ تغذیه بر اساس ۷٪ توده زنده در روز بود (Pazir *et al.*, 2008) که با میزان برابر در ساعت‌های ۶، ۱۴ و ۲۲ به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. قبل از غذاده هر بعد از ظهر؛ مدفوع و پوسته اسکلت خارجی پست‌لاروها از هر تانک به وسیله سیفون کردن برداشته می‌شد. همچنین میزان جیره روزانه هر ۱۰ روز یکبار با زیست‌سنجد نمودن میگوها محاسبه گردید.

جدول ۱: شرایط تیمارهای آزمایشی

تیمار	تغذیه و طرح آزمایش
شاهد	جیره پایه بدون دریافت پروبیوتیک
T1	غذای مکمل شده به‌وسیله باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری در غلظت $1/5 \times 10^6$ CFU/g feed
T2	غذای مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیک تجاری + بومی با نسبت برابر از هر یک (غلظت $1/5 \times 10^6$ CFU/g feed)
T3	غذای مکمل شده با باسیلوس‌های پروبیوتیک بومی در غلظت $1/5 \times 10^6$ CFU/g feed

### سنجهش فاکتورهای عصاره بدن میگو

به منظور سنجهش تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف در پست‌لاروها، در پایان دوره پرورش به علت کوچکی اندازه آن‌ها و عدم همولنفدهی به میزان کافی، از روش همگن کردن بدن آن‌ها استفاده شد (Postlethwaite & McDonald, 1995; Prodromo <sup>9</sup> et al., 2007). نمونه‌های هر تکرار با هم آمیخته شده <sup>9</sup> (Gullian *et al.*, 2004) و در دستگاه هموژنایزر له

همراه محیط کشت در مدت زمان ۸ ساعت فعال‌سازی و آماده گردید. اسپور بر روی محیط کشت ژلاتینه <sup>8</sup> TSA  $20^{\circ}\text{C}$  کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای (Gomez-Gil *et al.*, 1998) انکوباسیون شدند تا کلنی‌ها ظاهر شود (TSA آنتقال داده شد و به صورت خطی جهت خالص‌سازی و رقیق‌سازی کشت داده شدند).

باسیلوس‌های پروبیوتیک بومی (*B. subtilis licheniformis*) بکار رفته در این طرح از دستگاه گوارش بچه ماهیان انگشتقد فیل‌ماهی (*Huso huso*) جداسازی شدند که برای آماده‌سازی این پروبیوتیک‌ها، ابتدا سوسپانسیون هر دو باکتری بر روی محیط کشت ژلاتینه TSA کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  انکوباسیون گردیدند. سپس از کلنی‌های کشت داده شده و با استفاده از محلول نیمه مکفارلند و دستگاه آسپکتروفوتومتر (مدل Biochrom Libra S22) با تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (Zokaeifar *et al.*, 2012) برای تهیه دوز پروبیوتیک تجاری - بومی (با نسبت برابر از هر کدام) نیز به همین طریق عمل گردید. در نهایت دوز باکتریابی مورد نظر  $(1/5 \times 10^6)$  را که برای سه تیمار آزمایشی یکسان بود از طریق اسپری کردن به سطح غذای میگو اضافه شد. به جیره تیمار شاهد هیچ نوع مکمل پروبیوتیکی اضافه نگردید.

### طرح آزمایش

این آزمایش در مرکز تکثیر و پرورش آبزیان واقع در شهرستان گمیشان انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، ۶۰۰ قطعه پست‌لارو میگوی پا سفید غربی با میانگین  $(\pm \text{SD})$  وزنی  $50 \pm 6/54$  میلی‌گرم (PL<sub>15</sub>) از همین مرکز تهیه و پس از طی دوره آداتپاسیون و زیست‌سنجد اولیه، به مخازن رهاسازی گردیدند. آزمایش در ۱۲ مخزن فایبر‌گلاس ۵۰ لیتری پر شده با آب دریا که هر کدام به طور تصادفی  $50$  قطعه میگو را در بر می‌گرفت انجام شد و هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. در کل دوره آزمایش، نوسانات

<sup>9</sup> pooled

<sup>8</sup> Trypticase soy agar

سنخش لیزوژیم: سنخش لیزوژیم سرم خون از طریق جذب نوری و در طول موج  $450\text{ nm}$  اندازه‌گیری شد.

سنخش کورتیزول: به منظور اندازه‌گیری میزان کورتیزول از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون استفاده شد.

سنخش ایمونوگلوبولین M (IgM)<sup>۱۳</sup>: برای اندازه‌گیری IgM از روش نفلومتری<sup>۱۴</sup> استفاده شد. در این روش IgM موجود در نمونه سرم با آنتی‌بادی ضد IgM در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کرد شدن محلول می‌شود. نفلومتر نور تکرنگ موازی در طول موج‌های بین  $840 - 400\text{ nm}$  نانومتر به این محلول تابیده که پس از برخورد، به کمپلکس آنتی‌بادی و آنتی‌زن متفرق شده که میزان تفرق با مقدار IgM نسبت مستقیم دارد. برای کالیبراسیون و کنترل تست‌های فوق از Binding site استفاده شد (Siwicki & Anderson, 1993).

#### بررسی تراکم باسیلوس‌های روده

به منظور ارزیابی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت باسیلوس‌ها در روده میگویی تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک در انتهای دوره آزمایش، به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام گرفت. برای این کار ابتدا  $48$  ساعت قبل از نمونه‌برداری تغذیه میگوها قطع شده و در ادامه از هر تکرار  $1$  عدد میگو انتخاب و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید و سپس به مدت یک دقیقه در آب استریل قرار داده شد. در ادامه به منظور از بین بردن باکتری‌های سطح بدن میگو، نمونه‌ها در محلول بنزالکونیوم کلراید  $1/10$  درصد قرار گرفت و مجدداً توسط آب استریل شسته شد. در ادامه پس از جدا نمودن روده؛ نمونه برای هموژن‌سازی به هاون چینی استریل شده منتقل شد. سپس به میزان  $9$  برابر وزن روده، محلول نمکی نرمال استریل ( $NaCl$   $w/v ۸/۸۵$  درصد) به آن اضافه شد تا هموژن گردد و از محلول فوق رقت‌های سریالی در دامنه  $10^{-1} - 10^{-9}$  تا  $10^{-9}$  تهیه شد که در ادامه توسط نمونه‌بردار تحت شرایط استریل، حجمی معادل  $0/1$

شدند. سپس بدن له شده پستلاروها به لوله‌های شیشه‌ای استریل در  $4^{\circ}\text{C}$  انتقال داده شد و پس از آن درون دستگاه سانتریفیوژ با دور  $14000$  در دقیقه قرار گرفتند (Postlethwaite & McDonald, 1995; Prodocimo et al., 2007). در مرحله بعد مایع قسمت فوکانی لوله‌ها که همان عصاره بدن می‌باشد، برای اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی همولیف به آزمایشگاه منتقل گردید.

سنخش گلوکز: اندازه‌گیری میزان گلوکز در سرم به روش فتومتريک صورت گرفت (Thomas, 1998). اساس اين آزمایش به اين قرار است که آب اکسیژنه آزاد شده از گلوکز در مجاورت آنزيم گلوکز اکسیداز، با فنول و آمینو آنتی‌پيرین، آنزيم پراکسیداز تشکيل کینونيمين می‌دهد. میزان کینونيمين تشکيل شده به صورت فتومتريک قابل اندازه‌گيری است (با مقدار گلوکز رابطه مستقیم دارد). نمونه سرم حاوی محلول ضد انعقاد در دمای  $20 - 25^{\circ}\text{C}$  به مدت  $1$  روز نگهداری شد. پس از آن، نمونه‌ها به روش فتومتريک در برابر بلانک با طول موج  $546\text{ nm}$  قرار داده شده و ثبت گردیدند.

سنخش آلبومین: برای اندازه‌گیری آن از روش برومومکرزل گرین (BCG<sup>۱۰</sup>) کالریمتری بهره گرفته شد (Soltani et al., 2010). در این کیت از BCG جهت ایجاد کمپلکس با آلبومین و تولید رنگ قابل سنخش در طول موج  $640 - 546\text{ nm}$  نانومتر استفاده شد.

سنخش پروتئين کل: برای اندازه‌گیری پروتئين کل<sup>۱۱</sup> که شاخص تغییرات در سطح پروتئين می‌باشد از روش بیورت<sup>۱۲</sup> استفاده شد (Doumas et al., 1981). در این روش پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها در شرایط قلیایی با یون‌های مس دو ظرفیتی ایجاد کمپلکس آبی ارغوانی می‌کند که در طول موج  $546\text{ nm}$  نانومتر اندازه‌گیری شد. شدت رنگ حاصل مناسب با مقدار پروتئین کل در نمونه می‌باشد.

<sup>10</sup> Bromocresol Green

<sup>11</sup> Total protein

<sup>12</sup> Biuret

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-wilk بررسی شد.

### نتایج

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی میگویی پا سفید غربی باعث تغییر در سطوح فاکتورهای ایمنی در این میگو می‌شود (جدول ۲). در نتیجه این آزمایش مشخص شد که استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی موجب ایجاد اختلاف معنی‌داری در سطح گلوكز، کورتیزول و پروتئین کل در مقایسه با گروه شاهد می‌شود ( $P < 0.05$ ,  $df = 8$ ). بطوری که پایین‌ترین سطح گلوكز (۴۸۶/۶۶) و کورتیزول (۷/۶۵) به همراه بیشترین سطح پروتئین کل (۵/۵) در تیمار T1 (پروبیوتیک تجاری) بدست آمد. در مورد پارامتر آلبومین علی‌رغم اینکه بالاترین سطح آن در تیمار پروبیوتیک تجاری (۱/۱۹) بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ,  $df = 8$ ).

میلی‌لیتر برداشته شد (Rengpipat *et al.*, 1998; Mahious *et al.*, 2006) و به پلیت حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار منتقل و در سطح آن پخش گردید. پس از انجام کشت باکتریایی، پلیت‌های فوق به مدت ۷۲ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در داخل انکوباتور انکوباسیون شده و در پایان، شمارش کلندی‌های تشکیل شده بر اساس لگاریتم واحد کلندی (عکس ضریب رقت  $\times$  تعداد کلندی حاصله = CFU) انجام گردید (Abdollahi Arpanahi, 2013).

### تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن بر اساس شاخص‌های مورد بررسی به منظور بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها استفاده شد. از نرم افزار SPSS-16 جهت آنالیز داده‌ها و نرم افزار Excel 2007 جهت رسم نمودارها استفاده شد. همچنین

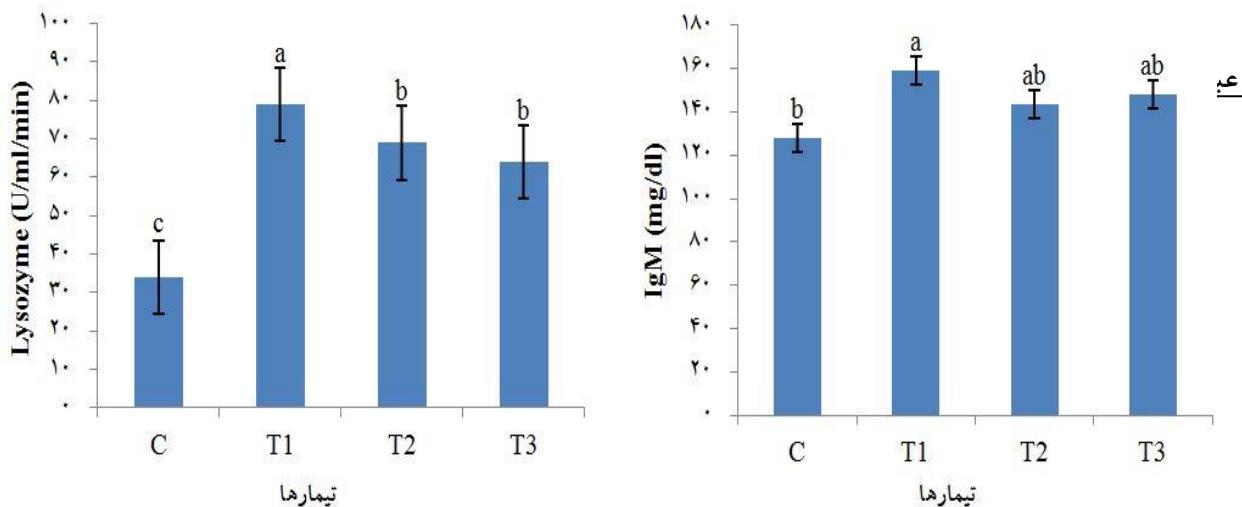
جدول ۲: فاکتورهای ایمنی حاصل از عصاره بدن پست‌لا رو میگویی پا سفید غربی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی باسیلوس‌های پروبیوتیکی

تیمارهای آزمایشی (Mean±SD)				پارامترهای ایمنی
تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	تیمار شاهد	(Mean±SD)
۷۱۶/۶۰±۳۱/۷۹ <sup>a</sup>	۶۵۰/۰۰±۲۳/۰ <sup>b</sup>	۴۸۶/۶۶±۲۹/۱۴ <sup>b</sup>	۷۴۶/۰۰±۱۷/۷۷ <sup>a</sup>	گلوكز (mg/dl)
۱/۱۴±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۱۵±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۱/۱۹±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۱۲±۰/۰۱ <sup>a</sup>	آلبومین (g/dl)
۵/۴۸±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۵/۶۹±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۵/۷۹±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۵/۱۱±۰/۰۵ <sup>c</sup>	پروتئین تام (g/dl)
۸/۵۰±۰/۲۳ <sup>b</sup>	۷/۸۵±۰/۴۲ <sup>b</sup>	۷/۶۵±۰/۲۵ <sup>b</sup>	۱۰/۶۷±۰/۵۱ <sup>a</sup>	کورتیزول (ng/ml)

\*حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌های است ( $p < 0.05$ ).

از جمله مهم‌ترین پارامترهای ایمنی، فاکتورهای لیزوژیم و ایمونوگلوبولین می‌باشند که در این آزمایش در تیمارهای آزمایشی و بخصوص تیمار پروبیوتیک تجاری (به ترتیب:

ترتیب: ۱۵۹، ۷۹، ۱۲۸، ۳۴) برخوردار بودند ( $P < 0.05$ ,  $df = 8$ ).

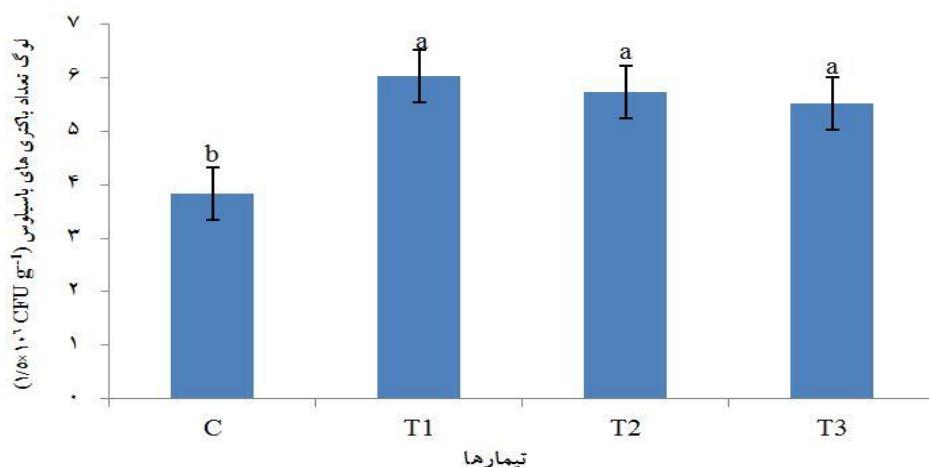


شکل ۲: میانگین ( $\pm$ SD) لیزوزایم عصاره بدن (بر حسب میلی گرم در دسی لیتر) در تیمارهای مختلف

شکل ۱: میانگین ( $\pm$ SD) ایمونو گلوبولین M عصاره بدن (بر حسب میلی گرم در دسی لیتر) در تیمارهای مختلف

باسیلوس‌ها در دستگاه گوارش میگوهای تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک تجاری (تیمار T1) در مقایسه با شاهد افزایش و به ترتیب با میانگین ( $\pm$ SD)  $log CFU^{-1} g^{-1}$   $6.03 \pm 0.08$  و  $3.88 \pm 0.06$  بود. لازم به ذکر است که از لحاظ آماری هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری‌های باسیلوس در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ,  $df = 8$ ). اما اختلافات عددی آن‌ها به وضوح نمایان بود.

سطح باکتری‌های باسیلوس در انتهای دوره پرورش بر حسب لوگ تعداد کلی در گرم وزن روده محاسبه و در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تعداد باکتری‌های باسیلوس در بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد وجود دارد ( $P < 0.05$ ,  $df = 8$ ). بالاترین تعداد باسیلوس بر روی محیط کشت TSA پس از ۶۰ روز پرورش در تیمار اول و به دنبال آن در تیمار دوم، تیمار سوم و گروه شاهد ثبت شد. جمعیت



شکل ۳: میانگین ( $\pm$ SD) لوگ تعداد باکتری‌های باسیلوس ( $CFU g^{-1}$ ) در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی در تیمارهای مختلف و شاهد در طی ۶۰ روز پرورش با باسیلوس‌های پروبیوتیکی.

## بحث

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، افزودن پروبیوتیک با غلظت  $10 \times 10^6 \text{ CFU g}^{-1}$  به جیره غذایی میگویی پا سفید غربی موجب ارتقاء سطح ایمنی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد گردید که بهترین نتیجه در تیمار T1 بدست آمد. استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری بیشتر بر روی بهبود کیفیت آب (Lalloo *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009 al., 2009; Chiu *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, Wang & Xu, 2010) و فعالیت آنزیم‌های هضمی (Wang & Gu, 2010 2007) متمرکز شده است، در مورد تأثیر باسیلوس بر روی پاسخ‌های ایمنی میگو مطالعات کمی وجود دارد.

مطالعات صورت گرفته بر روی پارامترهای بیوشیمیابی سرم خون در برخی از بیماری‌ها نشانگر بروز تغییرات معنی‌دار در برخی پارامترهای بیوشیمیابی سرم خون می‌باشد (Myner, 1993). پارامترهای بیوشیمیابی موجود در خون به عنوان شاخص با ارزشی برای نظارت بر سلامت و پاسخ‌های فیزیولوژیک تغذیه می‌باشد (Cnaani *et al.*, 2004) از آنجا که پارامترهای خونی شرایط نامناسب را بسیار سریع‌تر از سایر پارامترها نشان می‌دهند

از آن‌ها به طور وسیعی برای توصیف وضعیت سلامت جانور و ارزیابی پاسخ‌های استرس و سازش‌های فیزیولوژیک موجود استفاده می‌شود (Blaxhall, 1972). بر پایه این موضوع که تنظیم ایمنی میزان یکی از مقاصد سودمند مصرف پروبیوتیک است (Medina *et al.*, 2007)، مطالعه حاضر نشان داد که اختلاف معنا داری بین برخی از فاکتورهای بیوشیمیابی عصاره بدن موجود در گروه‌های پروبیوتیکی با گروه شاهد وجود دارد که در Kamgar *et al.*, 2012 موافقت با گزارشات اخیر است (Weifen *et al.*, 2012؛ Jalali Hajjiabadi *et al.*, 2009). در همین ارتباط پارامترهای گلوكز و کورتیزول شاخص‌های مناسب فیزیولوژیک جهت بررسی رخداد استرس می‌باشند و به هنگام وقوع مقدارشان افزایش می‌یابد (Schreck *et al.*, 2001؛ Kubilay & Vlukay, 2002) به‌طوری که با افزایش کورتیزول میزان گلوكز خون نیز افزایش می‌یابد

- سال بیست و سوم/شماره ۴/زمستان ۱۳۹۳  
شاخص‌های انواع استرس، مطالعه توأم این دو پارامتر در خون می‌باشد (Khodadadi *et al.*, 2009). بنابراین مناسب‌ترین در مطالعه‌ای Kamgar و همکاران (۲۰۱۳) از باکتری باسیلوس سابتیلیس با غلظت  $10^7 \text{ cells g}^{-1}$  به عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای استفاده کردند. پس از ۴۵ روز آن‌ها در معرض باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیا (*Streptococcus iniae*) قرار داده شدند. نتایج نشان داد که باسیلوس سابتیلیس موجب افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین کل و آلبومین سرم در تیمار حاوی پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد شد. آن‌ها دلیل افزایش این دو پارامتر در گروه آزمایشی را به تأثیر تعديل کننده ایمنی<sup>۱۵</sup> باسیلوس سابتیلیس بر سلول‌های کبدی مربوط دانسته‌اند که ظرفیت‌های آنابولیک سلول‌های کبدی در تولید پروتئین‌های خون را فعل می‌کند. در همین راستا نیز استفاده از باکتری باسیلوس سابتیلیس سبب افزایش معنی‌دار پروتئین کل در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) نسبت به گروه شاهد شد ولی از لحاظ فاکتور ایمنی آلبومین اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد (Weifen *et al.*, 2012).
- در مغایرت با نتایج این تحقیق Olmos و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که سطح گلوكز سرم در میگوهایی که از خوارک سویا<sup>۱۶</sup> مکمل شده با باسیلوس سابتیلیس تغذیه شده بودند نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در حالی که در آزمایش حاضر، بکارگیری پروبیوتیک‌های باسیلی موجب کاهش سطح گلوكز نسبت به تیمار شاهد شده است. همچنین در مطالعه‌ای استفاده از مکمل غذایی ال‌کارنیتین بر پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش در پارامترهای پروتئین تام و آلبومین سرم خون ماهی نسبت به گروه شاهد شد ولی میزان گلوكز خون تحت تأثیر این مکمل قرار نگرفت (Jalali Hajjiabadi *et al.*, 2009).

<sup>15</sup> immuno-modulatory

<sup>16</sup> soybeanmeal

لوله گوارش میگو در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد می‌باشد، که این امر به دلیل تغذیه مستقیم میگوها با جیره مکمل شده با پروبیوتیک است. با توجه به مشکلات پرورش میگو در ایران، استفاده از جیره‌های حاوی پروبیوتیک می‌تواند موجبات تقویت سیستم ایمنی میگو را فراهم آورد. با این وجود عدم قطعیت در نتایج گزارش شده توسط محققین مختلف در زمینه بکارگیری پروبیوتیک‌ها در آبزیپروری را احتمالاً می‌توان به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی و بهداشتی نگهداری موجود، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک موجود، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آنها، فرمولاسیون جیره غذایی، نوع پروبیوتیک انتخابی، غلظت مورد استفاده آن در جیره و نحوه اضافه کردن پروبیوتیک به جیره نسبت داد که ممکن است بر تأثیرات متفاوت پروبیوتیک روی رشد، بازماندگی و فاکتورهای ایمنی مؤثر باشد.

بررسی حاضر نشان داد که تیمار پروبیوتیک تجاری (T1) نتایج بهتری را نسبت به سایر تیمارها رائه نموده است. اما با این حال می‌توان گفت که بکارگیری و حضور پروبیوتیک‌های بومی در تیمارهای پروبیوتیک تجاری<sup>+</sup> بومی (T2) و بومی (T3) اثرات مثبتی را بر جای گذاشت ولی در مقایسه با پروبیوتیک تجاری میزان اثر گذاری پایین‌تر بود. دلیل حصول چنین نتایجی را شاید بتوان به تفاوت در شرایط محیط گوارشی ماهی ( محل جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بومی) و میگو، و یا استفاده از سویدهای برتر در پروبیوتیک تجاری مربوط دانست. این نتایج تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌های افزوده شده به جیره را در کاهش استرس با توجه به نظریات مطرح شده فوق اثبات می‌کند.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مجموعه دانشگاه گنبد کاووس علی‌الخصوص آزمایشگاه آبزیپروری و همچنین مرکز تکثیر و پرورش آبزیان گمیشان به جهت فراهم آوردن تسهیلات لازم برای انجام پژوهه‌صمیمانه قدردانی می‌شود.

با توجه به این موضوع که مقادیر آنزیم لیزوزیم به ویژه، در سرم خون منعکس کننده فعالیت منوسيت‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های فاگوسیتوز کننده می‌باشند (Pirarat *et al.*, 2006). بنابراین به طور مستقیم می‌توان تقویت سیستم ایمنی در پستلازوها میگو را در نتیجه افزایش این آنزیم در تیمارهای مربوط به پروبیوتیک دانست.

حقوقان دیگری از جمله Jorgensen و همکاران (1993) و Engstad و همکاران (1992) بیان نمودند که استفاده از محرك‌های ایمنی از جمله ویتامین C در جیره غذایی ماهیان باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم می‌شود. در مجموع پارامترهای سرمی تحت تأثیر تعداد زیادی از عوامل درونی و بیرونی مانند گونه و نژاد، درجه حرارت آب، چرخه تولید مثلی، نرخ متабولیک، سن، استرس، دوره‌های نوری، وضعیت تغذیه و روش استفاده در تعیین آن‌ها قرار دارد (Abdollahi & Imanpoor, 2011).

آنچنان که از نتایج این آزمایش بر می‌آید، باکتری‌های باسیلوس موجود در این آزمایش توانسته‌اند به خوبی فلور غالب باکتری‌های لوله گوارش میگوها را تشکیل دهند. در واقع شرط لازم برای اینکه یک پروبیوتیک بتواند اثرات خود را اعمال کند نیز همین استقرار در محیط و یا دستگاه گوارش است (شکل ۳). Fuller (1992) با بیان این مطلب که فلور دستگاه گوارش در مرحله نوزادی هنوز در حال تغییر است ذکر نموده است که این اصل کلی همواره حاکم است که تأثیر گذاری بر فلور دستگاه گوارش در طول این دوره در مقایسه با مراحل بعدی زندگی آسان‌تر است. به این دلیل که بعدها فلور نسبتاً ثابتی در لوله گوارش ایجاد می‌گردد. بنابراین می‌توان توصیه نمود که مصرف پروبیوتیک‌ها باید تا حد ممکن مدت کوتاهی پس از تخم‌گشایی و شروع تغذیه آغاز شود. Gomez-Gil و همکاران (1998) با اشاره به قابلیت آرتمیا جهت غنی‌سازی با دو گونه از باکتری‌های وبریو عنوان نمودند که این امر به شدت به نوع باکتری مورد استفاده، زمان در معرض قرار دادن آرتمیا با باکتری و وضعیت باکتری (زنده یا مرده بودن آن) بستگی دارد. به هر حال گذشته از این موضوع نکته‌ای که بیش از همه در این آزمایش جلب توجه می‌نمود، تعداد بیشتر باکتری‌های پروبیوتیکی در

## منابع

- Abdollahi Arpanahi, D., 2013.** Evaluation of *Bacillus* bacteria probiotic potential on growth performance, carcass biochemical composition, immune responses and intestinal flora of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. M.Sc. thesis, Gonbad Kavous University, Iran. 126P.
- Abdollahi, M. and Imanpoor, M.R., 2011.** Blood serum biochemical parameters of *Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870). Iranian Journal of Biology, 24, 915-924.
- Barton, B.A., Weiner, C.S. and Schreck, G.S., 1985.** Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42, 410-417.
- Chiu, C.H., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K. and Cheng, W., 2010.** Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, 29, 1053-1059.
- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M. and Hulata, G., 2004.** Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O.* *niloticus*. Aquaculture Research, 35, 1434-1440.
- Decamp, O., Moriarty, D.J.W. and Lavens, P., 2008.** Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research, 39, 334-338.
- Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T.J.R. and Schaffer, R.A., 1981.** Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and Validation. Clinical Chemistry, 10, 42-50.
- Engstad, R.E., Robertsen, B. and Frivold, E., 1992.** Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated hemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish Immunology, 2, 287-297.
- Farzanfar, A., 2006.** The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 48, 149-158.
- Fuller, R., 1992.** History and development of probiotics. In: Fuller R (Ed), Probiotics: The scientific of basis. Chapman & Hall, New York, pp.1-8.
- Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture: Review. Aquaculture, 180, 147-165.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Aberu-Grobis, F.A. and Roque, A., 1998.** Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the Brine shrimp (*Artemia franciscana*). Applied and

- Environmental Microbiology, 64, 2318-2322.
- Gómez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F., 2000.** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191, 259-270.
- Green, D., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Rica, E. and Cutting, S., 1999.** Characterization of two *Bacillus* probiotics. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4288-4291.
- Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J., 2004.** Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 233, 1-14.
- Jalali Hajiabad, M.A., Sadeghi, A.A., Mahbubi Sofyani, N., Chamani, M., Reyazi, G.H., 2009.** Effect of L-carnitine supplementation on blood parameters and growth of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources, 47, 105-115.
- Jorgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B., 1993.** Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease, 16, 313-325.
- Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M. and Ghane, M., 2013.** Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge infections. Advanced Studies in Biology, 5, 37-50.
- Khodadadi, M., Ansari, M., Peyghan, R., Mohammadi, G.H. and Raissy, M., 2009.** Evaluation of some serum parameters of Benni (*Barbus sharpeyi*) brood stocks in spawning season. Research Journal Science and Marine Technology, 4, 37-43.
- Kubilay, A. and Vlukay, G., 2002.** The effect of acute stress on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Zoology, 26, 249-254.
- Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Gorgens, J. and Gardiner, N., 2007.** Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology, 103, 1471-1479.
- Li, J.Q., Tan, B.P. and Mai, K.S., 2009.** Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 291, 35-40.
- Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, J.P. and Chen, J.C., 2004.** *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms, 61, 169-174.

- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. and Ollevier, F., 2006.** Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima*. Aquaculture International, 14, 219-229.
- Medina, M.I.E., Ennahar, S. and Sanz, Y., 2007.** Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strain: Relevance to probiotic selection and clinical applications. Clinical & Experimental Immunology, 150, 531-538.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2010.** Probiotic applications for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquaculture Nutrition, 16, 504-510.
- Myner, K., 1993.** Changes in serum protein composition occur in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. during *Aeromonas salmonicida* infection. Journal of Fish Diseases, 16, 601- 604.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. and Contreras, R., 2011.** Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by Soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* Probiotic strains. Marine Drugs, 9, 1119-1132.
- Pazir, M.K., Matinfar, A., Aeen Jamshidi, K.H., GhorbaniVaghei, R., Zarshenas, G.A. and Garibi, Q. 2008.** The effects of probiotics *Bacillus* sp. on the growth and survival rate of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 17, 27-34.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M. and Endo, M., 2006.** Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against, experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 113, 339-347.
- Postlethwaite, E. and McDonald, D., 1995.** Mechanisms of Na<sup>+</sup> and C-regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. The Journal of Experimental Biology, 198, 295-304.
- Prodocimo, V., Galvez, F., Freire, C.A. and Wood, C.M., 2007.** Unidirectional Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. Journal of Comparative Physiology, 177, 519-528.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P., 2000.** Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-288.
- Sakai M., 1999.** Current research status of fish immunostimulants in aquaculture. Aquaculture, 172, 63-92.

- Schreck, C.B., Contreas-Snchez, W. and Fitzpatrick, M.I., 2001.** Effects of stress on fish reproduction. Gamete Quality and Progeny. Aquaculture, 197, 3-24.
- Siwicki, A.K. and Anderson, D.P. 1993.** Non-Specific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Disease diagnosis and prevention methods, FAO-project GCP/INT/JPA, IFI, Olsztyn, Poland. pp.105-112.
- Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-musavi, H.A. and Zargar, A., 2010.** Effects of zataria multiflora essential oil on innat immune responses of Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal Fisheries and Aquatic Science, 5: 191-199.
- Teng, P.H., Lee, P.Y., Lee, F.C., Chien, H.W., Chen, M.S., Sung, P.F. and Su, C., Ou B.R., 2006.** Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* by ramification amplification assay. Diseases of Aquatic Organisms, 73, 103-11.
- Thomas, L., 1998.** Alanin aminotransferase (ALT), Aspartat aminotransferase (AST). In: Thomas L (Ed), Clinical laboratory diagnostics. TH-books verlagsgesell schaft. pp. 46-136 and 794-836.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S. and Liu,** C.H., 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish & Shellfish Immunology, 26, 339-344.
- Wang, Y.B. and Gu Q., 2010.** Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. Research in Veterinary Science, 89, 163-167.
- Wang, Y.B. and Xu, Z.R., 2007.** Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127, 283-292.
- Weifen, L., Xiaoping, Z., Wenhui, S., Bin, D., Quan, L., Luoqin, F., Jiajia, Z., Yue, W. and Dongyou, Y., 2012.** Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish Physiology and Biochemistry, 38, 1585-1592.
- Zhou, X.X., Wang, Y.B. and Li, W.F., 2009.** Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287, 349-353.
- Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A. and Nejat, N., 2012.** Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene

expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish &

Shellfish Immunology, 33, 683-689.

## Use of *Bacillus* probiotics for immune responses and intestinal microflora of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) post larvae

Abdollahi Arpanahi D.<sup>1\*</sup>; Jafaryan H.<sup>1</sup>; Soltani M.<sup>2</sup>;  
Gholipour Kanani H.<sup>1</sup>

\* dabdollahi8@gmail.com

1- Department of Fisheries, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran

2- Department of aquatic animal health, University of Tehran, Tehran, Iran

**Key Words:** *Litopenaeus vannamei*, Probiotic, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Immunity

### Abstract

The effect of dietary containing of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in three groups including commercial, commercial-indigenous and indigenous was investigated on the immune parameters (glucose, albumin, total protein, lysozyme, cortisol, immunoglobulin M (IgM)) and the intestinal flora of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae. The shrimp were fed for 60 days with four different diets: control (without probiotics), diet T1 supplemented with  $1.5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> commercial probiotic, diet T2 with  $1.5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> commercial-indigenous probiotic, diet T3 with  $1.5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> indigenous probiotic. At the end of experimental period, the levels of biochemical parameters (glucose, total protein, lysozyme, cortisol, IgM) of shrimp fed probiotic diets were significantly higher than in those shrimps fed the control diet for 60 days. However, albumin concentrations showed no significant difference between the experimental treatments and the control, but increased by 1.19, 1.15 and 1.14 after 60 days of feeding with diets T1, T2 and T3, respectively. Likewise, population density of *Bacillus* bacteria counted in digestive tract of shrimps treated with probiotic were significantly higher than the control group. Results of this study indicated that the addition of probiotic bacilli can improve immune parameters and modulates intestinal microbiota of shrimp (*L. vannamei*) post larvae.

---

\*Corresponding author