

تاثیر جیره حاوی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* IS02 بر شاخص های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی

بابک قائدنیا^{۱*}، مریم میربخش^۱ و سید محمد جلیل ذریه زهرا^۱

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۶

چکیده

در این پژوهش پروبیوتیک "تک سل" که بر اساس مطالعات ۸ ساله موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور (از ۱۳۸۸ لغایت ۱۳۹۵) در پژوهشکده میگوی کشور و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است، در جیره غذایی میگوهای پرورشی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزنی بیش از ۶ گرم افزوده شد (به سه مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg) و شاخص های سلامتی (شامل تعداد هموسیت کل، شمارش افتراقی هموسیت ها و میزان پروتئین پلاسما کل) میگوها در ابتدا و انتهای دوره آزمون، تعیین گردید. برای این منظور میگوها به صورت تصادفی انتخاب شده و در آکواریوم های ۱۵۰ لیتری (در هر آکواریوم ۳۰ قطعه) نگهداری شدند. میگوها در سه تیمار و هر کدام با سه تکرار تیمار بندی شدند و کنترل منفی (تغذیه با جیره فاقد پروبیوتیک و عدم مواجهه با عامل بیماری) و کنترل مثبت (صرفاً مواجهه با عامل بیماری) منظور شد. در هر تیمار، میگوها سه بار در روز به مدت ۴۰ روز با غذای پلت حاوی پروبیوتیک تک سل تغذیه شدند و در طول آزمون، پارامترهای دما، شوری و اکسیژن ثبت گردید. پس از ۴۰ روز نیز مواجهه با ویروس لکه سفید انجام شده و به مدت ۲ هفته روزانه تلفات و درصد بازماندگی ثبت شد. پس از نمونه گیری همولنف، شاخص سلامت، شامل تعداد هموسیت کل (Total Hemocyte Count, THC)، شمارش افتراقی هموسیت ها (Differential Hemocyte Count, DHC) و میزان پروتئین پلاسما کل (Total Plasma Protein, TPP) اندازه گیری و در تیمارها با گروه های شاهد مثبت و منفی، مقایسه گردید. بر اساس یافته های این پژوهش، می توان بیان کرد که تغذیه میگوهای سفید غربی با جیره های غذایی حاوی مقادیر 10^7 و 10^8 CFU/Kg موجب افزایش معنی دار ($P \leq 0/05$) عملکرد سیستم ایمنی میگوها و شاخص های سلامتی می گردد. افزون بر این تغذیه با جیره های غذایی مورد اشاره، در افزایش درصد بازماندگی میگوهای مواجهه یافته با ویروس لکه سفید در مقایسه با شاهد، موثر می باشد ($P \leq 0/05$).

کلمات کلیدی: میگوی سفید غربی، *Litopenaeus vannamei*، پروبیوتیک، شاخص های سلامتی، تعداد هموسیت کل، شمارش افتراقی هموسیت ها، میزان پروتئین پلاسما کل

مقدمه

با پیشرفت تکنولوژی، اهمیت پارامترهای محیطی در سیستم‌های مدیریتی آشکار گردید و سیستم‌های مدیریتی با تاکید بیشتر بر پایش پارامترهای محیطی طراحی و اجرا شد. ولی علی‌رغم اعمال مدیریت‌های بهداشتی کامل، برخی از فشارهای محیطی مثل استرس هنگام انتقال لاروهای میگو از هجری به مزرعه اجتناب ناپذیر می‌باشد. برای کارآمد بودن هر روش کنترلی در مدیریت بیماری باید بکارگیری آن روش بخشی از سیستم مدیریت بهداشتی جامعی باشد که در استخراج اعمال می‌شود. پروبیوتیک‌ها و محرک‌های سیستم ایمنی می‌توانند نقش مهمی در چنین سیستم‌هایی ایفا کنند (Bachère, 2000). پروبیوتیک یا Probiotics، Probiotic bacteria و Beneficial bacteria، باکتری‌هایی هستند که مترادف یکدیگر بوده و همگی برای باکتری‌های پروبیوتیک استفاده می‌شوند. پرورش میگو در سال‌های اخیر به یکی از عمده‌ترین فعالیت‌های اشتغال‌زا و سودآور در جهان تبدیل شده است، این صنعت در ایران از حدود ۲۰ سال پیش و با سرمایه‌گذاری بخش دولتی و خصوصی در استان بوشهر و پس از آن در سایر سواحل جنوبی کشور آغاز شد. بیماری‌های میگو همواره باعث ایجاد خسارات اقتصادی و اجتماعی زیادی به جامعه پرورش‌دهندگان و سایر حلقه‌های مرتبط در صنعت میگوی پرورشی شده است. در بین عوامل بیماری‌زا، ویروس لکه سفید بیماری‌زاترین عامل مرگ و میر و تلفات در میگوهای پرورشی است (Quang *et al.*, 2008).

بیماری‌های ویروسی خسارت زیادی را در تایوان، چین، اندونزی، ایران، هند، پاناما، هندوراس و اکوادور به صنعت آبرزی پروری وارد کرده‌اند. به طور کلی می‌توان بیان کرد که نیمکره غربی با ویروسی که از شرق آمد، یعنی عامل بیماری لکه سفید، می‌جنگد و نیمکره شرقی با ویروسی که از غرب آمد یعنی عامل بیماری دم قرمز تورا^۱ در ستیز است. برای درمان بیماری‌های ویروسی دارویی وجود ندارد ولی تکنیک‌های مدیریتی، اثرات ویروس‌ها را کاهش می‌دهد. هم‌اکنون تمامی مطالعات انجام شده در خصوص بیماری لکه سفید، لزوم بکارگیری ابزارهای مدیریتی پیشگیرانه برای کنترل آن را خاطر نشان می‌سازد. میزان برداشت میگوی پرورشی استان از سال ۱۳۷۴ لغایت ۱۳۸۳ از رشد مناسبی برخوردار بود؛ به طوری که در سال ۱۳۸۳ به ۵۶۰۰ تن رسید. میانگین وزنی اعلام شده تقریباً ۱۷ الی ۱۸ گرم بوده است که ارزش اقتصادی آن بالغ بر ۱۶۰ هزار میلیارد ریال می‌باشد، ولی در سال ۱۳۸۴ بدلیل بروز و شیوع بیماری لکه سفید (WSD) به حدود ۵۰۰ تن رسیده است. با توجه به پایین بودن میانگین وزنی میگوهای برداشت شده در این سال ارزش اقتصادی آن به حدود ۹۰ میلیارد ریال کاهش یافت (Salehi *et al.*, 2010).

در حال حاضر، پروبیوتیک‌های مرتبط با صنعت آبرزیان، به طور وسیعی در امریکا، ژاپن، کشورهای اروپایی، اندونزی و تایلند تولید و استفاده می‌شوند. یکی از اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بهبود عملکرد ایمنی آبرزیان پرورشی، در مقابله با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و در نهایت کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد شیمیایی و نیز پیشگیری از اپیدمی‌های ناگهانی

¹ Taura

یافت و همچنین موجب بهبود نرخ رشد شد. در مطالعه‌ای دیگر یک سویه از باسیلوس موجب بهبود کیفیت آب و افزایش میزان رشد و بازماندگی میگوهای پنئوس مونودون جوان و کاهش ویبریوهای بیماریزا می‌شود (Dalmin et al., 2001). با مطالعه Li و همکاران، در سال ۲۰۰۷، بر روی اثرات گونه باسیلوس لیکینیفرمیس^۱ بر روی فلور میکروبی روده و سیستم ایمنی میگوی سفید غربی مشخص شد باسیلوس لیکینیفرمیس در پرورش میگوی سفید غربی موجب مهار گونه‌های ویبریو از طریق حذف رقابتی شده و موجب بهبود عملکرد ایمنی میگو شد. بنابراین *Bacillus licheniformis* می‌تواند به عنوان یک محرک سیستم ایمنی در مکمل‌های غذایی مورد استفاده در آبی پروری، به منظور بهبود عملکرد ایمنی در میگوها، استفاده شود.

در سال ۲۰۱۰a، Liu و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر پروبیوتیک *Bacillus subtilis* E20 بر درصد بازماندگی، رشد، تحمل استرس و وضعیت ایمنی در لاروهای میگوی سفید غربی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که رشد لارو میگوها به طور قابل ملاحظه‌ای پس از افزودن پروبیوتیک به میزان 10^9 CFU/ml افزایش یافت و درصد بازماندگی لاروهای تیمار شده با پروبیوتیک به میزان معنی داری بیشتر از کنترل بود. بر اساس گزارش Zokaeifar و همکاران (۲۰۱۲) تغذیه میگوهای سفید غربی توسط دو سویه باسیلوس سابتیلیس به مدت ۸ هفته و سپس بررسی اثر آنها در پیشگیری از بروز ویبریوزیس نشان داد که استفاده از این باکتری‌ها سبب افزایش وزن نهایی، ضریب رشد و فعالیت آنزیمی در مقایسه با گروه کنترل

بیماری‌ها گزارش شده است (وشتانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ خانجانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Newman, 1999). آبی پروری در ایران یکی از محورهای توسعه استان‌های جنوبی و شمالی کشور محسوب می‌شود ولی کاربرد و توسعه پروبیوتیک در صنعت آبی پروری، در مقایسه با سایر کشورها، بسیار ناچیز است. از آن جهت که کنترل بیماری‌ها نیاز به اقدامات نوینی دارد که مقرون به صرفه، موثر و سازگار با محیط زیست باشند، استفاده از باکتری‌های مفید (پروبیوتیک‌ها) در صنعت پرورش آبیان به عنوان بهترین، ارزان‌ترین و موثرترین روش برای کنترل عوامل بیماریزا در مقایسه با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد (Salehi et al., 2010).

حسن‌نیا و همکاران (۱۳۸۱)، به منظور تعیین اثر باکتری *Pseudomonas Fluorescencia* بر رشد و بقای میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) در مرحله لاروی اولیه، پژوهشی انجام دادند. اثر باکتری در آزمایش‌های مختلف به صورت مکمل غذای زنده یا جایگزین جلبک بر لارو میگو مورد مطالعه قرار گرفت. آنها اعلام کردند که استفاده از 50 mg/L باکتری سودوموناس فلورسنس، می‌تواند تا ۲۶۶٪ بقاء، ۵۶٪ طول و ۱۲۲٪ وزن را بهبود بخشد. بر اساس مطالعات Jiravanichpasial و همکارانش در سال ۱۹۹۷ می‌توان از گونه‌های *Lactpbacillus spp.* به عنوان پروبیوتیک در *Penaeus monodon* استفاده کرد. در مطالعه‌ای که توسط Rengpipat در سال ۲۰۰۰ برای مطالعه بهبود عملکرد سیستم ایمنی در میگوی ببری سیاه به وسیله باکتری پروبیوتیک *Bacillus S11* انجام شد، نشان داد که در میگوهای تغذیه شده با این سویه، پارامترهای ایمنی به طور چشمگیری افزایش

انکوباتور یخچال‌دار (JSBI-250 C, JSR Inc,)
 (Korea)، انکوباتور شیکردار (JSSI-200CL, JSR)
 (Inc, Korea - 3-16PK)، سانتریفیوژ یخچال‌دار (UV-Vis)
 (Sigma Inc, Germany)، اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer 6800 Jenway Inc, England)
 هموژنایزر، هیتر، ترازو، هود لامینار، شوری‌سنج
 چشمی، پمپ هواده، پمپ کف‌کش، کلونی‌کانتور،
 دماسنج، فریزر ۲۰- و ۷۰- درجه سانتیگراد، آسیاب،
 همزن برقی، چرخ گوشت، پلیت ۸ سانتی‌متری، سر
 سمپلر زرد و آبی، میکروتیوب، پنبه، کووت، کلرید
 سدیم، آب مقطر، آب تصفیه شده دریا، فویل، محیط
 کشت Tryptice Soy Broth (Merk, Germany)،
 محیط کشت Thiosulfate Citrate Bile Salts
 (Merk, Germany) Sucrose Agar (TCBS).

این پژوهش در سالن مواجهه پژوهشکده میگوی
 کشور، در بوشهر و در اکواریوم‌های ۱۵۵ لیتری حاوی
 آب فیلتر شده و کلر زنی به مدت ۲ ماه شده انجام شده
 است و پروبیوتیک تک سل که بر اساس مطالعات ۸
 ساله پژوهشکده میگوی کشور (از ۱۳۸۸ لغایت ۱۳۹۵)
 و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است،
 در جیره غذایی میگوهای پرورشی سفید غربی با
 میانگین وزنی $7/02 \pm 0/89$ گرم افزوده شد (به سه
 مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg) و شاخص‌های
 سلامت (شامل THC، TPP و DHC) میگوها در ابتدا و
 انتهای دوره آزمون، تعیین گردید. برای این منظور
 میگوها به صورت تصادفی انتخاب شده و در
 اکواریوم‌های ۱۵۵ لیتری (در هر اکواریوم ۳۰ قطعه)
 نگهداری و آداپته شدند. هر کدام از سه تیمار با سه
 تکرار تیمار بندی شد و همچنین کنترل منفی (فاقد

گردید و همچنین ضریب رشد ویژه و درصد بازماندگی
 در میگو‌هایی که با دوز 10^8 CFU/ml از باکتری‌ها
 تغذیه شده بودند اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد
 داشتند. Mirbakhsh و همکاران (۲۰۱۳)، در پژوهش
 بر روی میگوی سفید غربی در استان بوشهر، پس از
 جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های موثر در تولید
 پروتیوتیک تاثیر هر یک از سویه‌های باکتریایی ISO2
 و ISO3، به عنوان پروبیوتیک‌های بومی در آزمایش‌های
 انجام شده بر روی پست لارو میگوی سفید غربی اعلام
 کرد، درصد مرگ و میر جمعی میگو‌هایی که با
 غذاهای حاوی پروبیوتیک، تغذیه شده بودند نسبت به
 گروه کنترل کاهش داشت ($P \leq 0/05$). در پژوهش
 حاضر تاثیر پژوهش سویه بومی باسیلوس سابتیلیس جدا
 شده از مزارع پرورش میگو بر شاخص‌های سلامتی
 میگو‌های سفید غربی مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از
 مشکلات عمده در مطالعات مربوط به روش‌های مورد
 استفاده جهت بهبود مقاومت میگو در شرایط مختلف و
 تیمارهای مختلف، انتخاب فاکتورهای مناسب جهت
 تعیین سلامت میگو است، لذا در این مطالعه سه فاکتور
 THC، DHC و TPP برای این منظور در نظر گرفته شد
 (Sanchez et al., 2001).

مواد و روش‌ها

سویه باکتری پروبیوتیک تک سل، باسیلوس
 سابتیلیس ISO2^۱ (GenBank: JN856456.1) با دوز
 10^{13} CFU/kg با فیلر کلسیم کربنات (نام تجاری
 تک سل - شرکت تک ژن زیست، ایران) می‌باشد.
 تجهیزات و مواد مصرفی مورد استفاده عبارتند از
 سمپلر، اتو کلاو (ایران طب زعیم)، فور، هموژنایزر،

¹ *Bacillus subtilis* ISO2

در این پژوهش ۲ گروه شاهد (مثبت و منفی) و سه تیمار و هر کدام با سه تکرار (به شرح جدول ذیل) منظور شد.

در مورد شاهد مثبت در مدت ۴۰ رور نخست با جیره غذایی فاقد پروبیوتیک تغذیه و در پایان ۴۰ روز با ویروس لکه سفید مواجهه داده شد. مواجهه در اکواریوم های ۱۵۵ لیتری که حاوی ۵۰ لیتر آب دریای فیلتر شده و کلر زده که از مرکز تولید میگوی عاری از بیماری خلیج فارس تامین شده بود انجام گردید. به مدت ۲ هفته درصد بازماندگی در تمامی تیمارها پیگیری و ثبت شد. برای آلوده کردن میگوها از تغذیه کردن میگوهای تیمارها و شاهد مثبت با میگوهای تلف شده بر اثر بیماری لکه سفید (که پس از انجام تست PCR، در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد منجمد شده بودند) برای آلوده کردن میگوها استفاده شد.

پروبیوتیک و عامل بیماری و کنترل مثبت (صرفاً پروبیوتیک) نیز منظور شد. در هر تیمار، میگوها سه بار در روز به مدت ۴۰ روز با غذای پلت شده حاوی پروبیوتیک تک سل تغذیه شدند (ساعات ۸ صبح، ۲ بعد از ظهر و ۱۰ شب) و پارامترهای دما، شوری و اکسیژن ثبت گردید. در آغاز و پایان دوره ۴۰ روزه، میگوها بیومتری و اطلاعات مربوطه ثبت شد و همچنین از میگوهایی که در فاز بین دو پوست اندازی بر اساس کلید شناسایی مراحل پوست اندازی (Promwikorn *et al.*, 2004) بودند، نمونه همولف جمع آوری شد و شاخص سلامت شامل THC، DHC و TPP، اندازه گیری و تعیین گردید و در تیمارها با گروه های شاهد مثبت و منفی، مقایسه شد (Zhenguo *et al.*, 2003).

جدول ۱: گروه های شاهد و تیمار، نوع تغذیه هر گروه، مواجهه یا عدم مواجهه با ویروس بیماری لکه سفید میگو، نام اختصاری منظور شده برای هر گروه و تعداد میگو در هر تیمار

نام اختصاری تیمار	تعداد میگو در هر تکرار	مواجهه با عامل ویروسی	تغذیه با جیره واجد پروبیوتیک
C1	۳×۳۰	منفی	شاهد منفی (پروبیوتیک- و مواجهه -)
C2	۳×۳۰	مثبت	شاهد مثبت (پروبیوتیک- و مواجهه +)
T1	۳×۳۰	مثبت	۱۰ ^۶ CFU/Kg در هر گرم خوراک
T2	۳×۳۰	مثبت	۱۰ ^۷ CFU/Kg در هر گرم خوراک
T3	۳×۳۰	مثبت	۱۰ ^۸ CFU/Kg در هر گرم خوراک

میلی لیتری مخصوص سانتی فیوژ که از قبل حاوی ml ۰/۴ آنتی کوآگولانت بود انتقال یافت و برای هر میگو دو اسمیر از همولف آسپیره شده، تهیه و در مجاورت هوا خشک شد. همولف باقی مانده در اپندورف ها تا ۱ ساعت پس از نمونه برداری بر روی یخ قابل نگهداری است.

برای تعیین THC، همولف از سینوس شکمی و از بند دوم نمونه برداری شد. برای این منظور از سرنگ ۱ml انسولین حاوی ml ۰/۴ آنتی کوآگولانت Alsever با دمای ۴ درجه سانتیگراد و pH برابر با ۷/۲ استفاده گردید (Jiang *et al.*, 2004). پس از نمونه برداری، محتویات سرنگ به اپندروف ۲

حلقوی فوق بستگی دارد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری و با منحنی استاندارد مقایسه شده و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین گردید.

روش تهیه غذای حاوی پروبیوتیک

برای اضافه کردن پروبیوتیک به غذای پلت شده به گونه‌ای عمل شد که پس از اضافه کردن آن به خوراک پلت شده، خوراک در آب حل نشود، برای این منظور آگار اضافه گردید (Zhang *et al.*, 2011, Chai *et al.*, 2016).

مراحل تهیه کردن جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پروبیوتیک تک سل:

- ۷- افزودن آگار، ۰/۵ تا ۰/۱ درصد وزن خشک
- ۸- مخلوط کردن با همزن با دور بالا
- ۹- نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد
- ۱۰- انتقال به دمای منفی ۱۵ درجه سانتیگراد
- ۱۱- تبدیل به قطعات مورد نظر
- ۱۲- نگهداری جیره‌های تولید شده در دمای ۴°C

آزمون‌های Post Hoc دانکن، توکی و جیمز-هاول استفاده شد.

نتایج

اثر پروبیوتیک بومی بر شاخص‌های سلامتی (THC و TPP) میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

برای تعیین DHC، اسمیرهای تهیه شده از همولمف به روش Gimsa – May Grunwad رنگ آمیزی شدند (Ghaednia *et al.*, 2011) و سلول‌های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی $100\times$ مورد بررسی قرار گرفتند (Kidchakan and Juadee, 2003).

برای اندازه‌گیری TPP از روش لوری استفاده شد. این روش بر اساس تبدیل Cu^{2+} به Cu^{+} در شرایط قلیایی و واکنش مس قلیایی با پروتئین‌ها و احیای فسفومولیدات (معرف فولین) توسط تیروزین و تریتوفان پروتئین‌ها استوار می‌باشد. در اثر ایجاد کمپلکس پروتئین‌ها با معرف فولین (ترکیبات آن عبارتند از: تنگستات سدیم و مولیدات سدیم در اسیدفسفریک و اسید کلریدریک) رنگ آبی ایجاد می‌شود که شدت رنگ حاصله به مقدار اسید آمینه‌های

- ۱- پودر کردن خوراک پلت شده
- ۲- افزودن آب (۳/۵ درصد وزن خشک)
- ۳- حرارت دهی در حمام آب گرم ۸۰°C
- ۴- مخلوط کردن با همزن با دور بالا
- ۵- افزودن پروبیوتیک به میزان تعیین شده در هر تیمار
- ۶- مخلوط کردن با همزن با دور بالا

برای تیمار بندی، در ابتدا جمعیت میگوهای جمع‌آوری شده از نظر نرمال بودن توزیع وزن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به حجم نمونه (تعداد میگوها بیش از ۵۰ عدد)، از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد برای تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه و برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد از

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، افزایش میزان پروتئین پلاسمای کل در میگوهای تیمار T3 پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره‌های حاوی 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک تک سل و همچنین ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس لکه سفید، اختلاف معنی داری با شاهد منفی و مثبت نشان داد.

تعداد هموسیت کل میگوهای سفید غربی در ابتدای تیمار بندی، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره‌های حاوی مقادیر تعیین شده پروبیوتیک تک سل در گروه شاهد منفی بین $70/67 \pm 9/45$ و $75/00 \pm 5/57$ تعیین گردید که بر حذف فاکتورهای مداخله کنند در روند آزمایش دلالت دارد (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد هموسیت کل ($\times 10^5$ cell/ml) در میگوی سفید غربی در ابتدای تیمار بندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک تک سل

تیمارها	تعداد هموسیت کل ($\times 10^5$ cell/ml)		
	در ابتدای تیمار بندی	پس از ۴۰ روز تغذیه	۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس
C1	$70/67 \pm 9/45^a$	$73/67 \pm 13/05^a$	$75/00 \pm 5/57^b$
C2	$69/00 \pm 6/56^a$	$72/33 \pm 12/50^a$	$39/33 \pm 14/01^a$
T1	$70/33 \pm 10/02^a$	$103/67 \pm 13/58^b$	$75/33 \pm 14/29^c$
T2	$72/00 \pm 8/72^a$	$126/33 \pm 6/03^c$	$73/33 \pm 12/39^c$
T3	$74/67 \pm 5/86^a$	$127/33 \pm 6/66^c$	$89/33 \pm 15/50^d$

وجود حروف a, b, c و d در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر تعیین شده در هر جدول می‌باشد.

جدول ۱: پروتئین پلاسمای کل (mg/ml) در میگوی سفید غربی در ابتدای تیمار بندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک تک سل

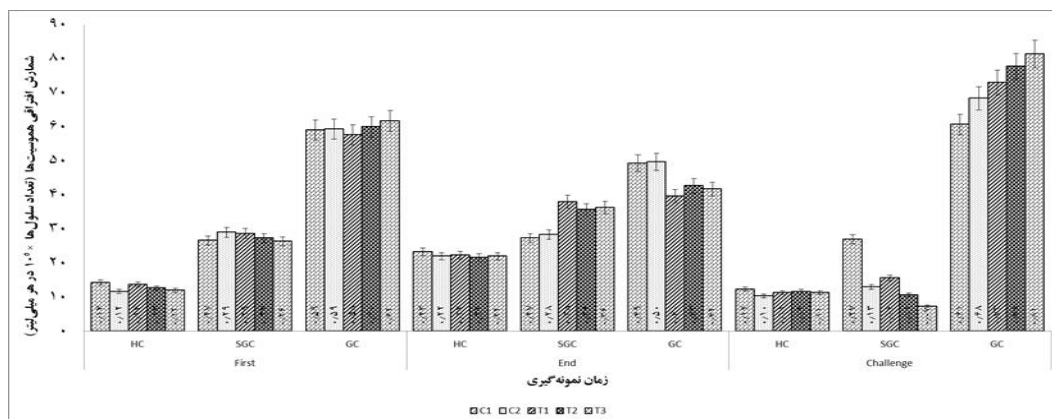
تیمارها	پروتئین پلاسمای کل (mg/ml)		
	در ابتدای تیمار بندی	پس از ۴۰ روز تغذیه	۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس
C1	$77/17 \pm 12/36^a$	$74/22 \pm 10/94^a$	$71/91 \pm 7/61^b$
C2	$72/42 \pm 10/51^a$	$73/43 \pm 19/36^a$	$48/27 \pm 6/21^a$
T1	$74/42 \pm 15/72^a$	$110/59 \pm 9/80^b$	$86/82 \pm 27/30^c$
T2	$78/79 \pm 11/02^a$	$107/63 \pm 11/74^b$	$105/85 \pm 15/05^c$
T3	$78/11 \pm 14/36^a$	$117/42 \pm 12/34^b$	$119/93 \pm 25/95^d$

وجود حروف a, b, c و d در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر تعیین شده در هر جدول می‌باشد.

اثر پروبیوتیک بومی بر شمارش افتراقی هموسیت‌های میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

تابلوی خونی مربوط به شمارش افتراقی هموسیت‌های میگوهای این مطالعه نشان می‌دهد

تغذیه با جیره‌های حاوی 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک تک سل، نشان داد که هموسیت‌های گرانولار که در مقابله با عوامل ویروسی نقش اصلی را ایفاء می‌کنند. افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهند (شکل ۱).



شکل ۱: شمارش افتراقی هموسیت‌ها ($\times 10^5$ cells/ml) در میگوی سفید غربی در ابتدای تیمار بندی و ۴۰ روز پس از تغذیه به جیره‌های حاوی با جیره‌های حاوی مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg پروبیوتیک تک سل. H: Hyaline cells, GC: Granular Cells, SGC: Semi Granular Cells

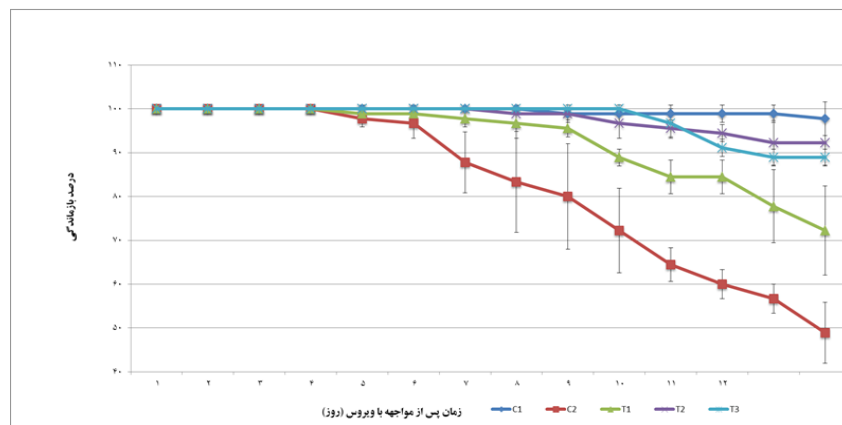
۷۶/۷±۵/۸ درصد رسید. آنالیز واریانس یک طرفه در هفته اول پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی در پایان هفته دوم اختلاف معنی‌داری در بازماندگی بین گروه شاهد مثبت و منفی ($P < 0.001$) مشاهده شد. در پایان هفته دوم نیز، میانگین بازماندگی در میگوهای شاهد مثبت با میگوهای تیمار T1 ($P = 0.027$)، تیمار T2 ($P = 0.001$) و تیمار T3 ($P = 0.003$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۴ و شکل ۲).

اثر پروبیوتیک بومی بر پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی در شرایط آزمایشگاهی

به میگوهای گروه شاهد منفی و مثبت و همچنین میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سه مقدار مختلف 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg از پروبیوتیک تک سل به مدت ۴۰ روز، در پایان دوره تغذیه، ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ویروسی به هر میگو تزریق شد (به غیر از گروه شاهد منفی که به جای سوسپانسیون ویروسی سرم فیزیولوژی در یافت نمودند)، در پایان دوره ۱۴ روزه پس از تزریق، میانگین بازماندگی بترتیب به ۸۰±۱۰، ۶۳/۳±۵/۸، ۴۰±۱۰، ۹۶/۷±۵/۸ و

جدول ۲: درصد بازماندگی میکوبهای سفید غریبی مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سه مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg از پروبیوتیک تک سل

تیمارها	تعداد میکروها	زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)، میزان بازماندگی (درصد) و تعداد میکوبهای زنده در هر تکرار													
		۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴			
C1	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
C2	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
T1	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
T2	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
T3	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)
	۳×۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۸۹±۱/۹۲ (۳۰ و ۲۹.۳۰)



شکل ۲: درصد بازماندگی میکوبهای سفید غریبی مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سه مقدار 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg از پروبیوتیک تک سل

بحث

در این پژوهش پروبیوتیک بومی "تک سل" که بر اساس مطالعات ۸ ساله موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در پژوهشکده میکوبی کشور و با همکاری شرکت تک ژن زیست تولید شده است، در جیره غذایی میکوبهای پرورشی سفید غریبی با میانگین وزنی بیش از ۶ گرم افزوده شد (به سه مقدار مختلف 10^6 (T1) و 10^7 (T2) و 10^8 (T3) CFU/Kg) و شاخص های سلامتی، شامل THC، TPP، و DHC میکوبا در ابتدای تیمار بندی، پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره های اشاره شده و ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس لکه سفید، تعیین گردید.

میکوبا مانند سایر بی مهرگان، به منظور دفاع و مقابله در برابر یک عفونت، کاملاً به سیستم ایمنی غیراختصاصی خود وابسته هستند و فاقد حافظه ایمنولوژیک شناخته شده در مهره داران می باشند (Bachère, 2000). بکارگیری پروبیوتیک ها در آبی پروری به منظور کنترل باکتری های بیماری زا، بهبود شاخص های رشد، تعدیل سیستم ایمنی و آنزیم های گوارشی میزبان گزارش شده است (Chai et al., 2016). در میان گونه های پروبیوتیک باکتریایی، خانواده باسیلاسه به طور گسترده ای در تکثیر و پرورش میکوبا استفاده می شود.

با توجه به نتایج بدست آمده، اختلاف معنی دار در شاخص‌های سلامتی و درصد بازماندگی میگوهای شاهد منفی (C1) در ابتدای تیمار بندی و پایان دوره تغذیه با جیره‌های حاوی پروبیوتیک، مشاهده نشد ($P \geq 0/05$). در گروه شاهد مثبت (C2) که بدون دریافت پروبیوتیک، صرفاً با ویروس لکه سفید مواجهه داشت، پس از مواجهه با ویروس، کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) در شاخص‌های سلامتی، THC و TPP مشاهده گردید. درصد بازماندگی آنها، 40 ± 10 تعیین شد که نشان از استرس و مرگ و میر شدید در این گروه است و تأییدی بر فعال بودن ویروس و تلفات ناشی از مواجهه با آن می‌باشد.

نکته بسیار مهم کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) و شدید THC در میگوهای C2، دو هفته پس از مواجهه با ویروس لکه سفید است (جدول ۲). با بررسی دقیق تابلوی خونی (DHC)، مشخص می‌شود که تعداد هموسیت‌های هیالین (Semi Granular Cells, SGC)، ۱۴ روز پس از مواجهه با ویروس کاهش پیدا کرده و جاندار با افزایش هموسیت‌های نیمه گرانولار (Granular Cells, GC)، تلاش کرده تا پاسخ سازگاری مناسبی به استرس مواجهه با ویروس لکه سفید بدهد (شکل ۱). با توجه به نقش GC در فعالیت‌های سابتو کسپیتی مهار عفونت‌های ویروسی، این واکنش، منطقی به نظر رسیده و این امر کاهش شدید هموسیت‌های SGC را توجیه می‌کند. این یافته با نتایج و یافته‌های عبداللهی آرپناهی و همکاران (۱۳۹۳) مطابقت دارد.

نکته‌ای که باید در تفسیر نتایج DHC با دقت مورد توجه قرار گیرد، افزایش نسبت هموسیت‌های SGC نسبت به GC ها در پایان دوره تغذیه با جیره‌های حاوی

پروبیوتیک در تیمارهای T1، T2 و T3 است. با توجه به مواجهه میگوها با پروبیوتیک باکتریایی "تک سل"، تغییر در تابلوی خونی و افزایش نسبی هموسیت‌های هیالین (Hyaline Cells, H) و SGC موجب کاهش نسبی هموسیت‌های GC شده است که این موضوع در پایان دوره ۱۴ روزه پس از مواجهه با ویروس تغییر کرده و تعداد هموسیت‌های H در تمام تیمارها، کاهش یافته و به درصد سلول‌های شاهد می‌رسد (شکل ۱) و با توجه به نقش حیاتی هموسیت‌های GC در مقابله با عوامل ویروسی، تعداد این سلول‌ها افزایش می‌یابد. مهمترین نقش ایمونولوژیک هموسیت‌های H، فاگوسیتوز می‌باشد و لی هموسیت‌های SGC در تشکیل ندول و کپسول نقش اصلی را ایفا می‌کنند (Bachère, 2000). این یافته‌ها با نتایج Gullian و همکاران (۲۰۰۴) هم‌خوانی دارد.

در تیمارهای T1، T2 و T3 که به ترتیب جیره‌های غذایی حاوی 10^6 و 10^7 و 10^8 CFU/Kg را دریافت کرده‌اند پس از تغذیه با این جیره‌ها به مدت ۴۰ روز دارای شاخص سلامتی بهتری در مقایسه با شاهد بوده و در خصوص THC مشاهده گردید که در پایان دوره تغذیه، در هر سه تیمار افزایش یافته و اختلاف معنی داری ($P \leq 0/05$) را با شاهد نشان می‌دهند و در بین تیمار T1 با دو تیمار T2 و T3 نیز اختلاف معنی داری مشاهده شده و میزان THC در دو تیمار T2 و T3 بیشتر است. پس از گذشت ۱۴ روز از مواجهه با ویروس، میزان THC در تیمار C2 به شدت کاهش یافته و تیمارهای T1 و T2 نیز اختلاف معنی داری با شاهد نشان نمی‌دهند ($P \geq 0.05$) ولی این میزان THC در تیمار T3 افزایش داشته و اختلاف معنی داری را با شاهد نشان داد ($P \leq 0/05$). همانطور که از نمودار DHC استنباط

جدول ۲). نکته مهم، بیشتر بودن درصد بازماندگی در تیمار T2 نسبت به تیمار T3 است. تمامی محرک های سیستم ایمنی حکم شمشیر دو لبه را داشته و در معرفی یک محرک سیستم ایمنی باید دقت نمود که محرک سیستم ایمنی مناسب، ترکیبی است که سیستم ایمنی جانور را به آرامی و به مقدار لازم تحریک نماید. تحریک بیش از حد سیستم ایمنی، موجب می گردد که بخشی از انرژی و توان فیزیولوژیک جانور، که باید منجر به تولید نهایی گردد، صرف افزایش سطح و عملکرد ایمنی جانور شود.

بر اساس یافته های این پژوهش، می توان بیان کرد که تغذیه میگوهای سفید غربی با جیره های غذایی حاوی مقادیر 10^7 و 10^8 CFU/Kg بر بهبود عملکرد سیستم ایمنی میگوها و تابلوی خونی آنها اثر مثبت داشته و موجب بهبود شاخص های سلامتی، تعداد هموسیت کل و میزان کل پروتئین پلاسما، می گردد. افزون بر این تغذیه با جیره های غذایی مورد اشاره، در افزایش درصد بازماندگی میگوهای مواجهه یافته با ویروس لکه سفید، موثر می باشد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه همکاران پژوهشگرده میگوی کشور و موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. حسن نیا، م. ر.، احمدی م. ر.، رضویلو، و.، ۱۳۸۱. بررسی اثر باکتری *Pseudomonas fluorescence*

می شود، جانور برای مقابله با عفونت ویروسی، تعداد هموسیت های GC را افزایش داده است به گونه ای که اختلاف معنی داری بین تعداد هموسیت های GC در تیمارهای T2 و T3 با تیمار T1 و شاهد های مثبت و منفی دیده می شود ($P \leq 0/05$). کاهش شدید هموسیت های SGC نشان از افزایش قدرت سازگاری میگوهای دریافت کننده پروبیوتیک در مقابسه با C1 و C2 در مقابله با عفونت ویروسی دارد (Supamattaya *et al.*, 2003). این یافته ها با نتایج Andrade محققین دیگر مطابقت نشان می دهد (Andrade, 2011, Zuo *et al.*, 2019).

همانطور که در خصوص نقش فعالیت هموسیتی در مواجهه و مقابله سیستم ایمنی میگو با عفونت های ویروسی بیان شد، در مطالعه TPP نیز مشاهده می شود که علی رغم کاهش شدید شاخص های THC و TPP در میگوهای C2 پس از گذشت ۱۴ روز از مواجهه با ویروس، اختلاف معنی داری بین شاخص TPP در میگوهای T1 و T2 مشاهده نمی شود و می توان این موضوع را به تحریک سیستم ایمنی میگوهای تیمارهای T1، T2 و T3 دانست. افزون بر این تیمار T3 اختلاف معنی داری را با سایر گروه ها نشان می دهد. یافته های مشابه پژوهش انجام شده توسط Liu و همکاران (۲۰۱۰b) نیز بر نقش پروتئین کل پلاسما در این خصوص تأکید کرده و با یافته های پژوهش جاری مطابقت نشان می دهد.

تعیین درصد بازماندگی در پایان دوره ۱۴ روزه پس از مواجهه با ویروس، اطلاعات به دست آمده از شاخص های سلامتی را تأیید کرده و کمترین درصد بازماندگی ($48/89 \pm 6/94$)، در شاهد C2 مشاهده شد (شکل ۲ و

8. Chai, P.C., Song, X.L., Chen, G.F., Xu, H., Huang, J., 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus, *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 602- 11.
9. Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 939-942.
10. Ghaednia, B., Mehrabi, M.R., Mirbakhsh, M., Yeganeh, V., Hoseinkhezri, P., Garibi, G., Ghaffar Jabbari, A., 2011. Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4), 616-630.
11. Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233, 1 – 14.
12. Jiravanichpasial, P., Chuaychuwong, P., Menasveta, P., 1997. The use of *Lactobacillus sp.* as the probiotic bacteria in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Poster session of the 2nd Asia-Pacific marine biotechnology conference and 3rd Asia-pacific conference on algal biotechnology. pp. 7-10, Phuket Thailand. P16.
13. Kidchakan, S., and Juadee, P., 2003. Morphology and immunological roles of hemocytes and fixed phagocytes in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, *Fish Pathology*, 38(2), 33-39.
14. Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., Hong, H., 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Biotechnol Letter*, 29, 525-530.
15. Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L., Wang, S.W. 2010a. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus* بر بازماندگی لاروهای میگوی سفید هندی، پژوهش و سازندگی، ۱۵، ۹۴-۹۸.
۲. خانجانی، م.ح.، سجادی، م.م.، علیزاده؛ م.، سوری نژاد، ا.، ۱۳۹۵. تولید و ارزیابی بیوفلوک به منظور به کارگیری در سیستم پرورشی بدون تعویض آب. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۰(۱)، ۳۳-۴۲.
۳. عبداللهی آرپناهی، د.، جعفریان، ح.ا.، سلطانی، م.، قلی‌ک.پ.ح.س.، ۱۳۹۳. بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک‌های باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور میکروبی روده پست لارو میگوی پاسفید غربی *Litopenaeus vannamei*. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۴)، ۱۰۵-۱۱۷.
۴. وشستانی، س.، عابدیان کناری، ع.ح.، اکرمی، ر.، 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، نشریه توسعه آبی‌پروری، ۸(۱)، ۱-۱۷.
5. Amoah, K., Huang, Q.C., Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, Q.H., Liu, H.Y., Dong, X.H., 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Fish and Shellfish Immunology*, 87, 796- 808.
6. Andrade, A.J., Nauwynck, H., and Sorgeloos P., 2011. Shrimp immunological reactions against WSSV: role of haemocytes on WSSV fate. Master's dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Aquaculture. 72p.
7. Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3- 11.

- export in Iran. *Aquaculture Animal Health*, 14(2), 29-31.
22. Supamattaya, K., Itami, J.T., Phromkunthong, K.C.W., Muroga, K., 2003. Morphology and Immunological Roles of Hemocytes and Fixed Phagocytes in Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Pathology*, 32(2), 33-39.
 23. Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z., 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture Research*, 42, 943-952.
 24. Zhenguo, Q., Ruiying, T., Ningyu, H., 1994. Three strains photosynthetic bacteria applied for Prawn diet and their cultural effect. *Marine Science*, 2, pp. 4-7.
 25. Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., 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 and Shellfish Immunology*, 33(4), 683-689.
 26. Zuo, Z.H., Shang, B.J., Shao, Y.C., Li, W.Y., Sun, J.S., 2019. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 160-168.
 - vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1031-41.
 16. Liu., K.F., Chiu., C.H., Shiu., Y.L., Cheng., W., Liu., C.H., 2010b. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837-44.
 17. Mirbakhsh, M., Akhavansepahy, A., Afsharnasab, M., Khanafari, A., Razavi, M.R., 2013. Screening and evaluation of indigenous bacteria as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 12(4), 873-886.
 18. Newman, S.G., 2013. A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. *Biotechnology benefiting aquaculture*, pp. 28-30.
 19. Quang, N.D., Hoa, P.T.P, Da, T.T., Anh, P.H., 2008. Persistence of White Spot Syndrome Virus in Shrimp Ponds and Surrounding Areas after an Outbreak. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156(1-4) 69-72.
 20. Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191,271-288.
 21. Salehi, H., 2010. The economic impacts of WSSV on shrimp farming production and