مقاله علمی – پژوهشی:

اثر پروبیوتیک *Bacillus vallismortis* IS03 بر عملکرد رشد و کارایی خوراک میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در استخرهای خاکی

بابک قائدنیا*[۱]، مریم میربخش[۱]، محمدخلیل پذیر[۲]، محمود بهمنی[۱]، محمود حافظیه[۱]

*b.ghaednia@areeo.ac.ir

۱- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده میگوی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۲

چکیده

عملکرد مثبت باکتری‌های سودمند (پروبیوتیک‌ها) در ارتقای تولید آبزیان موضوعی اثبات شده بوده است و خانواده Bacillaceae از پرکاربردترین باکتری‌ها در آبزی‌پروری محسوب می‌شوند. این مطالعه به منظور بررسی و مقایسه اثر پروبیوتیک بومی *Bacillus vallismortis* IS03 (JQ085958.1) با غلظت 10^{11} CFU در کیلوگرم، بر عملکرد رشد، کارایی خوراک و میزان بیومس برداشت شده میگوی سفید غربی در استخرهای پرورشی خاکی انجام شد. برای این منظور دو تیمارشامل افزودن پروبیوتیک به آب و افزودن پروبیوتیک به خوراک و یک گروه شاهد (بدون پروبیوتیک) در نظر گرفته شد. طی ۱۰۰ روز دوره پرورش در استخرهای پرورشی با تراکم ذخیره‌سازی ۵۰۰ هزار عدد در هکتار، کمترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار آب (۱/۶۰) و سپس در تیمار خوراک (۱/۶۲) ثبت شد که با گروه شاهد (۱/۷۴) اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). درصد بازماندگی در تیمار آب (۸۰/۷۲ درصد) و در تیمار خوراک (۸۰/۰۹ درصد) ثبت گردید که بین تیمار آب و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). بیشترین میزان بیومس برداشت شده به‌ترتیب در تیمار آب و سپس در تیمار خوراک بود که با شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<0/05$). میزان نرخ رشد نسبی و ویژه در تیمارها با شاهد، اختلاف معنی‌داری نداشت ($p<0/05$). اما میزان وزن نهایی میگو در زمان برداشت در تیمار آب با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). با توجه به اثرات مثبت و معنی‌داری پروبیوتیک *Bacillus vallismortis* IS03 در روش افزودن به آب بر میزان بازماندگی، بیومس برداشت شده و ضریب تبدیل غذایی، می‌توان این باکتری را به عنوان پروبیوتیک مناسب برای افزودن به آب استخرهای پرورش میگو پیشنهاد نمود.

لغات کلیدی: پروبیوتیک، میگو، *Bacillus vallismortis*، شاخص رشد، ضریب تبدیل غذایی، بیومس

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

روند رو به رشد پرورش میگو و افزایش سیستم‌های متراکم و فوق متراکم، توجه پرورش‌دهندگان را به خوراک با کیفیت، کاهش ضریب تبدیل غذایی و سوددهی اقتصادی بیشتر معطوف داشته است. افزودنی‌های غذایی و تولید خوراک فراسودمند از جمله راهکارهایی است که علاوه بر تامین مواد مغذی لازم برای بهبود رشد آبزیان پرورشی، می‌تواند در افزایش سلامت و مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا مفید واقع شوند. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که از جمله این افزودنی‌های غذایی محسوب می‌شوند و به عنوان افزودنی غذایی به منظور بهبود سلامت یا ارتقاء کیفیت استخرهای پرورشی استفاده می‌شوند.

راندمان خوراک مصرفی آبزیان، به دلیل عدم هضم کامل خوراک مصرفی در دستگاه گوارش میگو، سبب افزایش ضریب تبدیل غذایی و به دنبال آن کاهش سود حاصل از پرورش می‌شود. یکی از اقدامات انجام شده برای افزایش قابلیت هضم و کارایی خوراک، افزودن پروبیوتیک‌ها به صورت افزودنی در خوراک آبزیان، برای اطمینان از جذب مناسب مواد غذایی و در نتیجه رشد بهینه است (Kumar *et al.*, 2016).

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با تولید جهانی قریب به ۶ میلیون تن، یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی جهان را تشکیل می‌دهد (FAO, 2023) و در ایران نیز بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران کل میگوی پرورشی تولیدی، به میزان تولید ۵۸ هزار تن، از این گونه است. با توجه به این که آبزیان در سوسپانسیونی از میکروارگانیسم‌ها مختلف به‌سر می‌برند به‌ویژه کفزیانی مانند میگو در بستر استخرهای پرورشی زیست می‌نمایند، در مواجهه دائمی با میکروارگانیسم‌های مختلف هستند و مدیریت میکروبی استخرهای پرورشی، در کنترل بیماری‌ها و سلامت میگوها، بسیار مهم است (Zhang *et al.*, 2006). پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری علاوه بر استفاده به عنوان افزودنی خوراکی، به عنوان بهبوددهنده محیط زیست آبزیان نیز مطرح هستند. ارزش بازار افزودنی‌های خوراک میگو در سال ۲۰۱۸ برابر با ۶۶ میلیون دلار گزارش شده و تخمین زده می‌شود که تا پایان سال ۲۰۲۴ به بیش از ۱۰۴ میلیون دلار برسد که طی سال‌های ۲۰۲۴-۲۰۱۹، نرخ رشد مرکب سالانه، به میزان ۷/۸ درصد پیش‌بینی می‌شود. تمایل پرورش‌دهندگان به سیستم‌های پرورش فوق متراکم و وابستگی این سیستم‌ها به افزودنی‌های خوراکی، به منظور تعدیل سیستم ایمنی میگو و حفظ سلامت محیط پرورش آن، رو به رشد است (Emerenciano *et al.*, 2022). افزودنی‌های خوراکی و محرک‌های ایمنی گوناگونی از جمله مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، فیتوبیوتیک‌ها، اسانس‌ها، پلی‌ساکاریدهای میکروبی و دریایی، نوکلئوتیدها، رنگدانه‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها در بازار در دسترس هستند (Bachère, 2000; Ju *et al.*, 2009; Barman *et al.*, 2013; Nimrat *et al.*, 2013; Nugroho and Fotedar, 2013; Zhao *et al.*, 2016)، ولی داده‌های محدودی در مورد اثربخشی آنها در شرایط تجاری به‌ویژه در شرایط فوق‌متراکم وجود دارد. خانواده Bacillaceae یکی از رایج‌ترین گونه‌های مورد استفاده در صنعت آبزی‌پروری بوده و مطالعات زیادی بر آنها انجام شده است. سویه‌های *Bacillus*، باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و اسپوردار هستند. این باکتری‌ها به‌واسطهٔ تولید اسپور در محیط‌های زیست گوناگون مانند خاک، آب، دستگاه گوارش جانوران و ... یافت می شوند و از توانایی تجزیه سوبستراهای متفاوتی با منشاء گیاهی و حیوانی مانند سلولز، نشاسته، پروتئین و هیدروکربن‌ها برخوردارند (Su *et al.*, 2020). علاوه‌براین، گونه‌های *Bacillus* از نظر فیزیولوژی دارای انواع نیتریفایرهای[1] هتروتروف، دنیتریفایر[2]، تثبیت‌کننده نیتروژن، شیمیولیتوتروف[3] اختیاری و ... هستند (Hlordzi *et al.*, 2020) این گوناگونی در خصوصیات فیزلوژیک، سبب تنوع سویه‌های *Bacillus* و توانایی کلونیزه شدن آنها در گسترهٔ وسیعی از زیستگاه‌های اکولوژیک شده است. همچنین به دلیل توانایی تولید پپتیدهای دارای خاصیت ضد میکروبی[4] و آنزیم‌های مختلف مانند لیپاز، پروتئاز و آمیلاز در بسیاری از

[1] Nitrifying (باکتری‌های شوره‌گذار)

[2] Denitrifying (باکتری‌های نیترات‌زدا)

[3] Chemolithoautotrophic (باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد)

[4] Bacteriocin

صنایع مانند آبزی‌پروری مورد توجه قرار گرفته‌اند (James *et al*., 2021; Abdel-Latif *et al*., 2022). در این پژوهش اثر باکتری بومی *Bacillus vallismortis* IS03 جداسازی شده از استخرهای پرورش میگو، بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی، میگوهای پرورش یافته در استخرهای خاکی، تعیین گردید.

مواد و روش کار

تیماربندی

این پژوهش در سایت‌های پرورش میگوی دلوار استان بوشهر در مزرعه تجاری ۲۰ هکتاری، دارای ۱۶ استخر خاکی هر کدام به وسعت ۱/۲ هکتار و با تراکم ذخیره‌سازی ۵۰۰ هزار عدد لارو میگو در هکتار با میانگین وزنی ۰/۳۴±۴/۰۸ گرم (بیومتری روز ۳۰ ام پرورش) و تحت مدیریت مزرعه‌دار و به منظور بررسی تاثیر باکتری بومی *Bacillus vallismortis* IS03 جداسازی شده از استخرهای پرورش میگو با کد ثبت جهانی JQ 0859851 (تولید کارخانه تک ژن زیست- ایران) با فیلر مالتودکسترین، بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی انجام شد (Mirbakhsh *et al*., 2013; Mirbakhsh *et al*., 2022b). بدین‌منظور، ۹ استخر خاکی از بین ۱۶ استخر مزرعه به روش کاملاً تصادفی انتخاب شد. دو تیمار شامل افزودن پروبیوتیک به آب (TWD) و افزودن پروبیوتیک به خوراک (TFD) و یک گروه شاهد (TCD)، هر کدام با سه تکرار در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی اولیه استخرهای مورد مطالعه، مدیریت کف استخر و سیستم فیلتراسیون آب ورودی به استخرهای پرورشی در این مطالعه، بر اساس دستورالعمل‌های سازمان دامپزشکی کشور صورت پذیرفت. کلیه تیمارها از خوراک کنسانتره تجاری کارخانه هوواش (پروتئین خام ۳۸ درصد، چربی ۹ درصد، فیبر خام۳ درصد، خاکستر ۱۴ درصد و رطوبت ۱۰ درصد) تغذیه شدند. هر مزرعه برای تامین لارو مورد نیاز برای ذخیره‌سازی در استخرها، از یک مرکز تکثیر استفاده کردند و سعی شد تیماربندی و ذخیره‌سازی بر اساس شرایط یکسان به صورت هم‌زمان انجام گردد. روزانه طی ۳ مرحله (صبح، ظهر و عصر) و در ۳۰ روز اول بر اساس بیوماس استخر به صورت جیره کور غذادهی انجام شد. پس از ۳۰ روز، میزان غذادهی برای هر استخر به صورت مجزا محاسبه گردید. بدین‌ترتیب، میزان خوراک طبق جدول غذایی شرکت سازنده، درجه حرارت آب، بیوماس استخر (معمولاً ۵ درصد) و با توجه به وضعیت سینی غذادهی، مدیریت شد. اطلاعات میزان غذادهی طی دوره پرورش به صورت روزانه برای هر استخر ثبت و در نهایت در روز برداشت با جمع‌بندی اطلاعات ثبت شده، میزان غذای مصرفی هر استخر محاسبه گردید. اندازه‌گیری عوامل فیزیکی و شیمیایی آب (دما، اکسیژن محلول و pH)، روزانه دو بار و شوری یک‌بار اندازه‌گیری شد. نمونه‌گیری به صورت هفتگی و کاملاً تصادفی با پرتاب تور پرتابی و بیومتری شامل وزن کل، با ترازوی دیجیتال با دقت صدم گرم حدود ۴۰-۳۵ نمونه از هر تکرار انجام شد. این عملیات در طول دوره پرورش از روز ۳۰ پرورش به صورت هفتگی تا روز برداشت صورت گرفت. در روز برداشت، ۱۰۰ قطعه میگو از هر استخر توزین و ثبت شد (Yuvaraj and Karthik, 2015).

طبق نتایج مطالعات پیشین، غلظت 10^{11} CFU در کیلوگرم پروبیوتیک *Bacillus vallismortis* IS03 با در نظر گرفتن غلظت نهایی 10^{8} CFU Kg^{-1} به استخرها، به دو روش (۱) افزودن پروبیوتیک به آب و (۲) اسپری روی سطح خوراک میگو طی ۱۰۰ روز پرورش انجام شد (Mirbakhsh *et al*., 2013; Mahjoub *et al*., 2019).

روش آماده‌سازی پروبیوتیک برای افزودن به آب

برای آماده‌سازی پروبیوتیک و افزودن به استخر پیش از ذخیره‌سازی میگو، پس از شخم زنی، آهک پاشی و شستشوی استخرها در آغاز دوره پرورش، در زمان آبگیری به منظور ایجاد بلوم پلانکتونی و ذخیره‌سازی پست لاروها، ابتدا ۵۰۰ گرم پروبیوتیک به ازاء هر هکتار، در ۲۰ لیتر آب استخر حل و به مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شد. سپس در بخش‌های مختلف استخر توزیع شد؛ ۱۵ روز پس از ذخیره‌سازی نیز میزان ۲۵۰ گرم پروبیوتیک به ازای هر هکتار، طبق روند قبلی، آماده‌سازی و سپس به آب استخر اضافه گردید. این روند هر ۱۰ روز یکبار تکرار شد (Balcázar *et al*., 2007; Mirbakhsh *et al*., 2020; Mirbakhsh *et al*., 2022b). افزودن پروبیوتیک به آب

استخر، هنگام صبح هم‌زمان با تغذیه میگوها انجام گردید. تلاش شد طی دوره پرورش زمان افزودن پروبیوتیک به استخر و تعویض آب هم‌زمانی نداشته باشد و در صورت هم‌زمانی، پروبیوتیک پس از تعویض آب، افزوده شود (Wang, 2007).

روش آماده‌سازی پروبیوتیک برای اسپری بر خوراک میگو

بر اساس مطالعات قبلی، به منظور آماده‌سازی پروبیوتیک و افزودن به خوراک، از روش اسپری کردن پروبیوتیک بر خوراک استفاده شد (Mirbakhsh *et al*., 2022b). در هفته اول و دوم پرورش به ازاء هر ۲۰ کیلوگرم خوراک میگو، ۱۰ گرم پروبیوتیک و ۲۰ گرم نشاسته ذرت (به عنوان هم‌بند) در ۰/۵ لیتر آب حل و پس از هوادهی، در سطح پلت‌ها به صورت یکنواخت اسپری و پس از خشک شدن سطح پلت‌ها در سایه، غذادهی صورت گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

در پایان دوره، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ رشد نسبی (RGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و درصد بازماندگی (SR) تیمارهای مختلف مطابق فرمول‌های ذیل محاسبه شد (Velasco *et al*., 1999; Venkat *et al*., 2004). همچنین میزان بیوماس برداشت شده و میزان خوراک مصرفی در پایان دوره پرورش، طبق اطلاعات ثبت شده طی دوره پرورش و زمان برداشت مورد مقایسه و تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت:

$$\text{نرخ رشد ویژه (\%)} = \frac{\text{Ln}[\text{وزن نهایی (گرم)}] - \text{Ln}[\text{وزن اولیه (گرم)}]}{t2 - t1} \times 100$$

وزن اولیه و وزن نهایی، میانگین وزن (g) در زمان‌های t1 وt2 (روز پرورش) است:

$$\text{نرخ رشد نسبی} = \frac{\text{وزن نهایی (گرم)} - \text{وزن اولیه (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}} \times 100$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \frac{\text{خوراک مصرفی (وزن خشک به گرم)}}{\text{وزن نهایی (گرم)} - \text{وزن اولیه (گرم)}}$$

$$\text{نرخ بازماندگی} = \frac{\text{تعداد میگوها در انتهای دوره آزمایش (قطعه)}}{\text{تعداد میگوها در ابتدای دوره آزمایش (قطعه)}} \times 100$$

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، پس از بررسی برابری واریانس گروه‌های آزمون با استفاده از آزمون لون (Levene's Test) و آنالیز واریانس یک طرفه، برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد از آزمون‌های Post Hoc دانکن و توکی HSD استفاده شد. تمامی آنالیزها با استفاده از ورژن ۲۶ نرم افزار SPSS انجام پذیرفت.

نتایج

میانگین وزن میگو

میانگین وزن نهایی میگوها در تیمارهای TWD برابر با ۶۲/۸۳±۲۴/۰ گرم و در استخرهای TFD ۳۱/۰۹±۲۲/۱ بود که با هم در سطح اطمینان ٪۹۵ اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۱- الف). همچنین هر دو تیمار آب و خوراک در استخرهای مورد مطالعه در سطح اطمینان ٪۹۵ با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (p=۰/۰۰۲).

نرخ رشد ویژه (SGR)

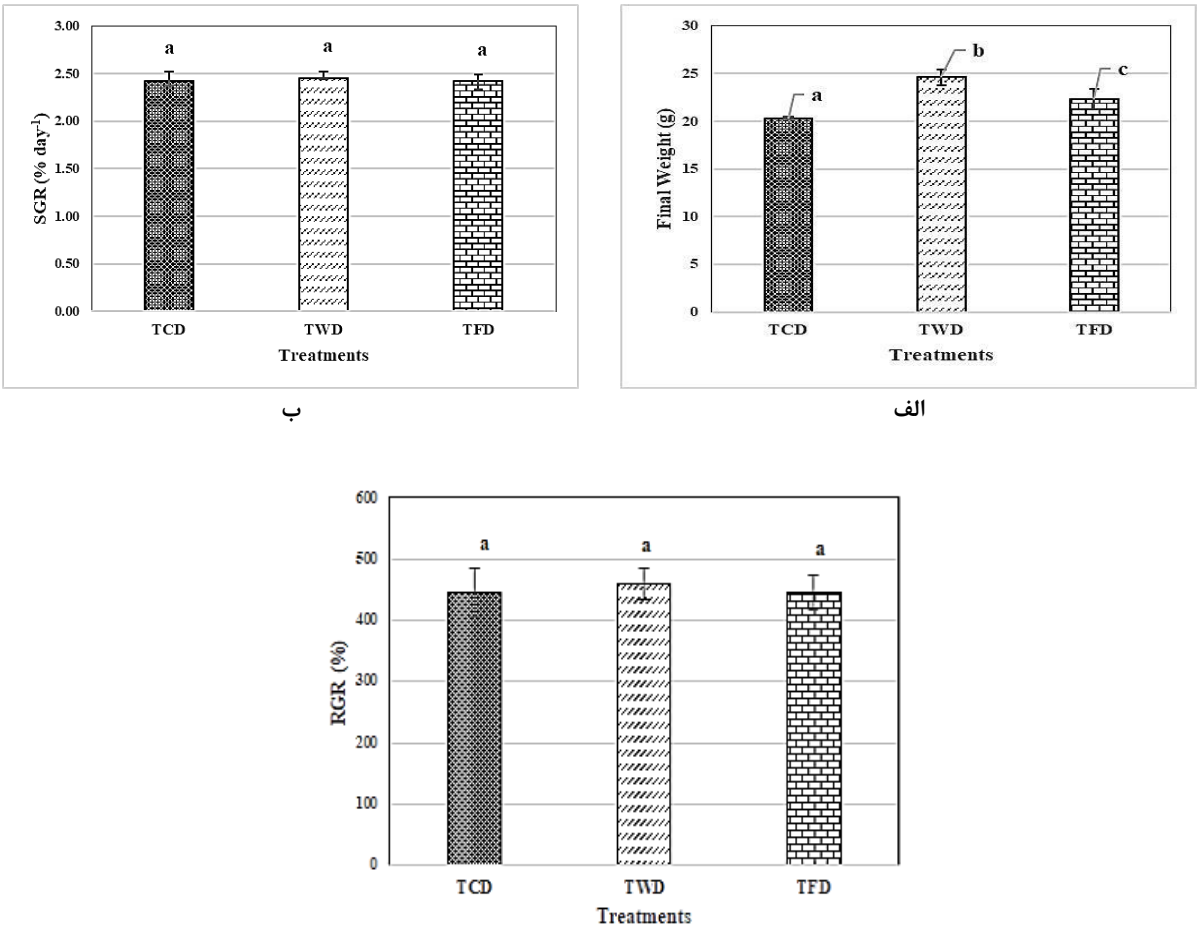
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در سطح اطمینان ٪۹۵، اختلاف معنی‌داری بین ضریب رشد ویژه در تیمارهای TFD و TWD و بین تیمارها با شاهد نیز وجود نداشت (p=۰/۷۶۹) (شکل ۱- ب).

نرخ رشد نسبی (RGR)

نرخ رشد نسبی میگوها در تیمارها با شاهد در سطح اطمینان ٪۹۵، اختلاف معنی‌داری نداشت (p=۰/۸۳۹) (شکل ۱- پ).

ضریب تبدیل غذایی

نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد که میانگین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای TFD و TWD با تیمار شاهد در سطح اطمینان ٪۹۵، اختلاف معناداری داشت (p=۰/۰۰۱) (شکل ۲- الف).



شکل ۱: مقایسه میانگین وزن نهایی (الف) نرخ رشد ویژه، (ب) و نرخ رشد نسبی، (پ) میگوی سفید غربی در دو تیمار TWD و TFD با گروه شاهد.حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری است (p<۰/۰۵). TWD، TFD و TCD به ترتیب مربوط به تیمارهای افزودن پروبیوتیک به آب، خوراک و شاهد است.

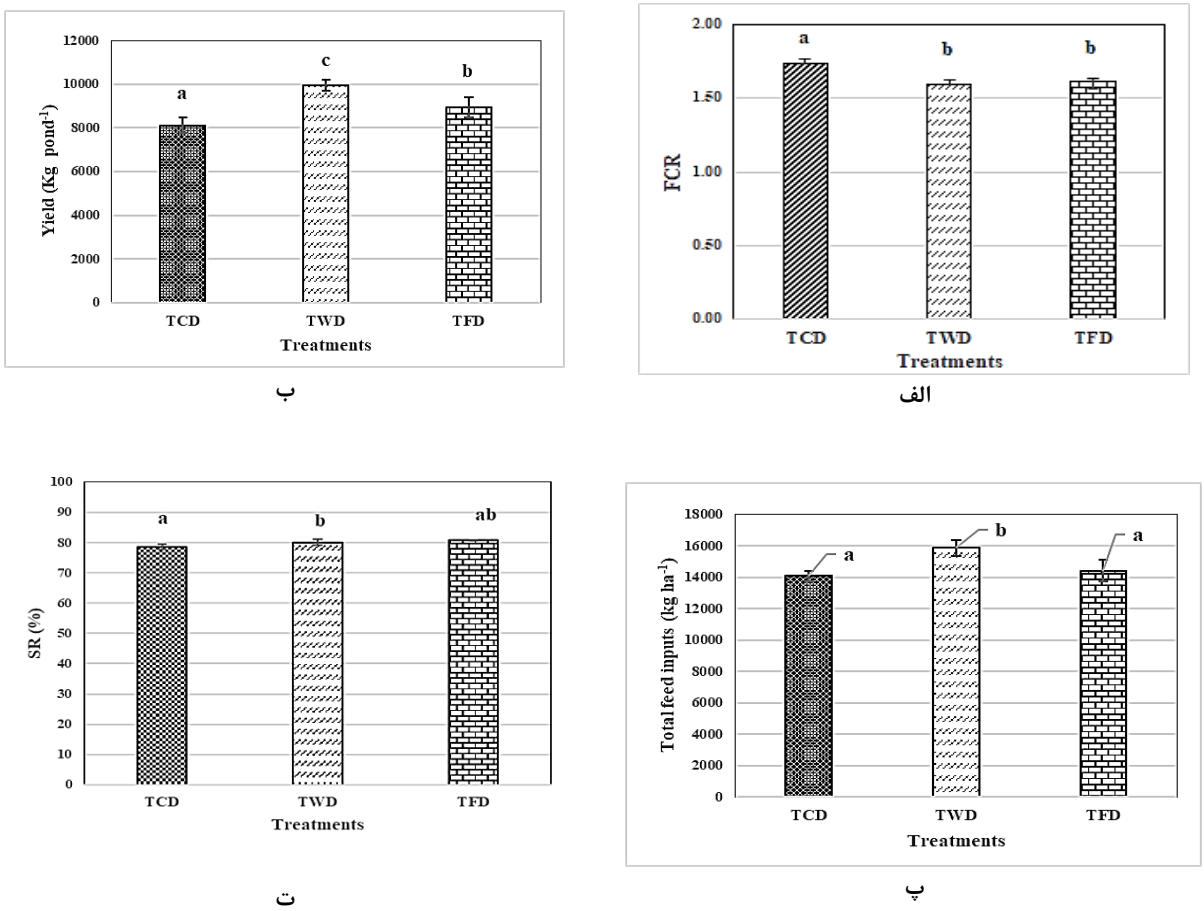
Figure 1: Comparison of average final weight (a), specific growth rate (b) and relative growth rate (p) of *Litopenaeus vannamei* in TWD, TFD and the control. Different letters indicate significant differences (p<0.05). TWD, TFD, and TCD are related to the treatments of adding probiotics to water, feed, and the control, respectively.

میزان بیومس برداشت شده

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در سطح اطمینان ٪۹۵، اختلاف معنی‌داری بین میزان بیومس برداشت شده در تیمارها و شاهد وجود دارد (p=۰/۰۰۲). تیمار آب ۲۲/۳۹ درصد و تیمار خوراک ۱۰/۰۶ درصد از تیمار شاهد برداشت بیشتری داشتند. به عبارت دیگر، میانگین میزان برداشت در تیمار آب و خوراک به‌ترتیب ۱۸۱۷/۳۳ کیلوگرم و ۸۱۶/۶۷ کیلوگرم از تیمار شاهد بیشتر بود (شکل ۲-ب) که این تفاوت در سطح اطمینان ۹۵٪ بین گروه شاهد (TCD) با خوراک (TFD) و آب (TWD) معنادار بود. همچنین اختلاف معنادار بین تیمار آب و خوراک مشاهده شد (p<۰/۰۵).

میزان خوراک مصرفی

میزان خوراک مصرفی در تیمارهای TFD و TCD در سطح اطمینان ٪۹۵، اختلاف معناداری نداشتند، اما بین تیمار TWD با تیمار TFD و TCD اختلاف معناداری مشاهده شد (p<۰/۰۵) (شکل ۲- پ).



شکل ۲: مقایسه ضریب تبدیل غذایی (الف)، میزان بیومس برداشت شده (ب)، میزان خوراک مصرفی (پ) و درصد بازماندگی (ت) استخرهای پرورش میگوی سفید غربی در دو تیمار TWD و TFD با گروه شاهد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی داری است (p<۰/۰۵). TWD، TFD و TCD به‌ترتیب مربوط به تیمارهای افزودن پروبیوتیک به آب، خوراک و شاهد است.

Figure 2: Comparison of food conversion ratio (a), harvested biomass (b), consumed feed (c) and survival rate (c) of *Litopenaeus vannamei* in culture ponds in TWD, TFD, and the control. Different letters indicate significant differences (p<0.05). TWD, TFD, and TCD are related to the treatments of adding probiotics to water, feed, and the control, respectively.

درصد بازماندگی

درصد بازماندگی بین تیمار TCD (۷۸/۵۶ درصد) با تیمارهای TWD(۸۰/۷۲ درصد) و TFD (۸۰/۰۹ درصد) در سطح اطمینان ۹۵٪، اختلاف معناداری داشت (p=۰/۰۳۹) (شکل ۲-ت).

از نظر پایش عوامل فیزیکی و شیمیایی (دما، اکسیژن محلول و pH)، بین تیمارهای شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین میزان شوری آب استخر پرورش میگو مربوط به ماه مرداد ۰/۵±۵۱ و کمترین آن مربوط به خرداد ماه ppt ۰/۳۲ ±۴۳ و همچنین بیشترین و کمترین میزان دما نیز در طی دوره پرورش به ترتیب مربوط به ماه های مرداد ۰/۲۲ ±۳۴/۷ °C و خرداد ۰/۱۶ ±۲۶/۰ درجه سانتی‌گراد بود، میزان pH آب نیز در کل دوره پروش در دامنه ۱±۷/۵ ثبت شد.

بحث

بر اساس یافته‌های مطالعات دهه اخیر در سیستم‌های فوق متراکم، استفاده از مکمل‌ها و افزودنی‌ها، نقش مهمی در به حداقل رساندن استفاده از آنتی‌بیوتیک در پرورش میگو و کاهش بروز بیماری و تحریک رشد دارند. افزودنی‌های

خوراک و آب محل پرورش آبزیان از طریق تحریک سیستم ایمنی، تأمین مواد مغذی ضروری، بهبود کیفیت آب و حفظ میکروبیوم دستگاه گوارش موجب افزایش شاخص‌های سلامتی در آبزی می‌شوند (Kumar *et al*., 2016; Dawood *et al*., 2018).

مطالعات بسیاری در خصوص اثربخشی پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری انجام شده است، اما اکثر مطالعات در شرایط آزمایشگاهی بوده و اثربخشی پروبیوتیک‌ها در مزرعه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (Hasan and Banerjee, 2020; Mirbakhsh *et al*., 2022b). با توجه به شرایط پیچیده اکوسیستم پرورش میگو در استخر، بررسی اثربخشی پروبیوتیک نیاز به مطالعات مزرعه‌ای دارد.

در مطالعه حاضر، میزان ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تیمار با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت به‌طوری‌که در TWD، ۰/۱۴ و TFD، ۰/۱۲ کمتر از TCD بود. میانگین وزن زمان برداشت میگوها در تیمار TWD ۵/۲۳ گرم و تیمار TFD ۱/۳۰ گرم از تیمار شاهد بیشتر بود و با توجه به این‌که اختلاف بین میزان بازماندگی تیمارهای آب و خوراک با گروه شاهد به‌ترتیب ۲/۷۵ و ۱/۹۴ درصد ثبت شده، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک به آب سبب افزایش معنی‌داری وزن نهایی میگوها نیز گردیده است. همچنین میزان بیومس برداشت شده از استخرهای تیمار TWD ۲۲/۳۹ درصد و تیمار TFD ۱۰/۰۶ درصد از تیمار شاهد بیشتر بود که با در نظر گرفتن سایر عوامل، نشانگر اثربخشی باکتری *Bacillus vallismortis* IS03 در استخرهای پرورش میگو است، زیرا این باکتری با افزایش درصد بازماندگی در استخرها و کاهش ضریب تبدیل غذایی، بر افزایش تولید نهایی استخرهای پرورشی خاکی و کاهش هزینه‌های تولید، موثر بوده است. پروبیوتیک‌های جنس *Bacillus* به دلیل دارا بودن قابلیت‌های گوناگون از جمله کمک به هضم غذا به‌واسطه تولید آنزیم‌های خارج سلولی (پروتئاز، لیپاز، آمیلاز و کربوهیدرولاز)، تولید ویتامین‌ها و کمک به تجزیه ترکیبات غیرقابل هضم و تولید ترکیبات ضدباکتریایی، تاثیر قابل‌توجهی بر نرخ رشد و درصد بازماندگی دارند (Abriouel *et al*., 2011; Mirbakhsh *et al*., 2013; Olmos and Paniagua-Michel, 2014; Mahjoub *et al*., 2019). نتایج مشابهی در سایر پژوهش‌ها از نظر بهبود نرخ رشد ویژه و درصد بازماندگی در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر اثر *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی میگوی *Litopenaeus stylirostris* برای پیشگیری از بروز بیماری *Vibriosis* ناشی از *Vibrio nigripulchritudo* در شرایط استخرهای خاکی صورت گرفته است، درصد بازمارندگی ۱۵-۷ درصد افزایش و بیومس برداشت شده ۱۲-۸ درصد نسبت به شاهد بیشتر بود و ضریب تبدیل غذایی در استخرهایی که از پروبیوتیک استفاده کرده بودند، کاهش نشان داد (Castex *et al*., 2008; Castex *et al*., 2010). در پژوهشی دیگر اثر مخلوطی از پروبیوتیک‌های مختلف تجاری حاوی انواع باسیلوس‌ها (برای افزودن به آب)، باکتری‌های *Streptococcus faecalis, Clostridium Butyricum, Bacillus mesentericus*، مخمر، آنزیم های لیپاز و پروتئاز (برای افزودن به خوراک) و باکتری‌های *Rhodobacter* spp و *Rhodococcus* spp (برای افزودن به خاک)، در استخرهای پرورش نیمه‌متراکم میگوی *Penaeus monodon* در هند مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که میزان رشد و بازماندگی در استخرهایی که از پروبیوتیک استفاده کردند، بیشتر از گروه‌های شاهد بود. علاوه‌براین، تعداد باکتری‌های کل در پایان دوره در استخرهایی که از پروبیوتیک استفاده شد، کمتر از استخرهای شاهد بود. همچنین در میگوهای استخرهای شاهد، مواردی مانند: آبشش سیاه، microsporidiosis (بیماری انگلی) و بیماری قارچی گزارش شد، اما در استخرهایی که پروبیوتیک استفاده کرده بودند، این موارد مشاهده نشد (Soundarapandian *et al*., 2010). در مطالعه‌ای دیگر نیز که اثر مخلوطی از پروبیوتیک‌های آب، خوراک و خاک حاوی انواع باکتری‌های *Bacillus* در استخرهای پرورش میگوی مونودون مورد بررسی قرار گرفت، میزان رشد روزانه، کیفیت آب و خاک در استخرهایی که از پروبیوتیک استفاده کردند، اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (Hossain *et al*., 2013).

در مطالعه Mirbakhsh و همکاران (۲۰۲۰) بر اثربخشی باکتری *Bacillus vallismortis* IS03 (پروبیوتیک تک‌سل) بر عوامل رشد میگوی سفید غربی در استخرهای خاکی صورت گرفت، افزودن باکتری مذکور به خوراک میگو موثرتر از افزودن پروبیوتیک به آب استخرهای پرورشی بود و بیشترین میزان تولید در تیمار غذا (۳۸۰۳ کیلوگرم) مشاهده شد که با تیمار شاهد (۳۲۹۵ کیلوگرم)، اختلاف معنی‌داری داشت (Mirbakhsh *et al*., 2020).

ضریب تبدیل غذایی می‌تواند به صورت غیرمستقیم نشان‌دهنده میزان سوددهی به ازاء مصرف مقدار مشخصی از خوراک باشد، زیرا ۷۰-۵۰ درصد از کل هزینه‌های جاری مربوط به یک دوره پرورش، هزینه تامین خوراک کنسانتره است. در نتیجه، بهبود توانایی آبزی در تبدیل خوراک مصرفی به گوشت یا وزن زنده، یک اصل مهم در سوددهی آبزی‌پروری خواهد بود. این بدان معناست که هر گونه تغییر کوچکی در ضریب تبدیل غذایی می‌تواند تاثیر بسیار مهمی بر حاشیه سود و سود مالی پرورش‌دهنده داشته باشد. بر اساس یافته‌های مطالعه صورت گرفته در استخرهای پرورش میگوی خاکی، اختلاف بسیار جزئی در ضریب تبدیل غذایی استخرهای تیمار و شاهد منجر به اختلاف میزان خوراک مصرفی و در نهایت سود بیشتر به ازاء هر هکتار گردید. همچنین بر اساس نتایج، افزودن باکتری *Bacillus vallismortis* IS03، در استخرهای خاکی پرورش میگو، به‌ترتیب باعث افزایش میزان برداشت بیومس به میزان ۱۸۱۷/۳۳ کیلوگرم و ۸۱۶/۶۷ کیلوگرم در تیمارهای TWD و TFD نسبت به شاهد شد. با توجه به این‌که میزان برداشت در تیمار آب ۱۰۰۰/۶۷ کیلوگرم بیشتر از تیمار خوراک بود، لذا استفاده از باکتری *Bacillus vallismortis* IS03 در آب محل پرورش میگو پیشنهاد می‌شود.

مسئله قابل توجه دیگر در این خصوص، تمایل بیشتر کارگران مزارع میگو به افزودن پروبیوتیک به آب به علت راحت‌تر بودن عملیات آماده‌سازی به نسبت اسپری روی خوراک است (براساس مصاحبه با سرکارگرهای مزرعه‌های پرورش میگو) و با در نظر گرفتن اثربخشی *Bacillus vallismortis* IS03 در آب استخر و مطالعات پیشین در خصوص قابلیت رشد و تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی به‌وسیله این باکتری از شوری ppt ۱۵ تا بیش از ppt ۵۵ و قابلیت هتروتروفیک نیتریفیکاسیون (Mirbakhsh *et al*., 2022a)، لذا استفاده از این باکتری بومی به عنوان پروبیوتیک در آب استخرهای پرورش میگوی مزارع شمال و جنوب کشور پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به سازگاری این باکتری با شرایط اکولوژیک منطقه، می‌توان از آن در پژوهش‌های آینده بر سیستم‌های فوق متراکم پرورش میگو و بایوفلاک بهره برد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت پرورش‌دهندگان سایت پرورش میگوی دلوار (استان بوشهر) انجام شده است. از پرسنل و معاون برنامه‌ریزی و پشتیبانی پژوهشکده میگوی کشور (آقای صمد راستی) که طی اجرای پروژه، نهایت همکاری را داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Abdel-Latif, H.M., Yilmaz, E., Dawood, M.A., Ringø, E. and Ahmadifar, E., Yilmaz, S., 2022. Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551:737951. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.737951

Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N.B. and Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 351, 201-232. DOI:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x

Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191(1-3):3-11. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00413-0

Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T. and Cunningham, D.P., 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 962:147-150. DOI:10.1016/j.jip.2007.04.008

Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C. and Kumar, V., 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 33:1-11. DOI:10.4172/2155-9910.1000134

Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L., Schmidely, P. and Mariojouls, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275(1-4):182-193. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.01.011

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. and Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 284:622-631. DOI:10.1016/j.fsi.2009.12.024

Dawood, M.A., Koshio, S. and Esteban, M.A., 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 104:950-974. DOI:10.1111/raq.12209

Emerenciano, M.G., Rombenso, A.N., Vieira, F.D.N., Martins, M.A., Coman, G.J., Truong, H.H., Noble, T.H. and Simon, C.J., 2022. Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. *Animals*, 12(3): 236. DOI: 10.3390/ani12030236

FAO, 2023. Fishery and Aquaculture Statistics – Yearbook 2020. FAO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics. Rome, Italy. 220 P. DOI:10.4060/cc7493en

Hasan, K.N. and Banerjee, G., 2020. Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1): DOI:53.10.1186/s41936-020-00190-y

Hlordzi, V., Kuebutornye, F.K., Afriyie, G., Abarike, E.D., Lu, Y., Chi, S., Anokyewaa, M.A. 2020. The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18:100503. DOI:10.1016/j.aqrep.2020.100503

Hossain, M., Kamal, M., Mannan, M. and Bhuyain, M., 2013. Effects of probiotics on growth and survival of shrimp (*Penaeus monodon*) in coastal pond at Khulna, Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, 52:363-370. DOI:10.3329/jsr.v5i2.11815

James, G., Das, B.C., Jose, S., VJ, R.K., 2021. *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*, 29:323-53. DOI:10.1007/s10499-020-00630-0

Ju, Z.Y., Forster, I.P. and Dominy, W.G., 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp *(Litopenaeus vannamei)*. *Aquaculture*, 292(3-4):237-243. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.04.040

Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K. and Sarkar, U.K., 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 244:342-368. DOI:10.1080/23308249.2016.1193841

Mahjoub, M., Mirbakhsh, M., Afsharnasab, M., Kakoolaki, S. and Hosseinzadeh, S., 2019. Inhibitory activity of native probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 against pathogenic *Vibrio harveyi* under *in vitro* and *in vivo* conditions in *Litopenaeus vannamei*. *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal*, 5(2):54-66. DOI:10.29252/ijaah.5.2.54

Mirbakhsh, M., Akhavansepahy, A., Afsharnasab, M., Khanafari, A. and Razavi, M.R., 2013. Screening and evaluation of indigenous bacteria from the Persian Gulf as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(4):873-886. DOI:20.1001.1.15622916.2013.12.4.14.3

Mirbakhsh, M., 2019. Study on the effect of probiotic bacteria *Bacillus subtilis* IS02 on growth, health, Immunity and gastric enzymes indexes of cultured *Litopenaeus vannamei*, Iranian Fisheries Science Research Institute, Iran, 24-40. (in Persian)

Mirbakhsh, M., Berenji, M., Mohajeri Borazjani, Z., Ghaednia, B.and Nazari, M. A., 2020. Comparison of different preparation methods of functional food diets containing native probiotic Takcell® on the growth performance of Western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae stage. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 29(3):71-81. DOI:20.1001.1.10261354.1399.29.3.10.2 (in Persian)

Mirbakhsh, M., Ghaednia, B. and Tabatabaee Bafroee, A.S., 2022a. An In vivo and In vitro assessment of the probiotic potentials of indigenous halotolerant bacteria on growth performance and digestive enzymes of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in high-salinity waters. *Aquaculture Nutrition*, 2022:2704224, DOI:20222704224.10.1155/2022/2704224.

Mirbakhsh, M., Ghaednia, B., Zorriehzahra, M. J., Esmaeili, F. and Faggio, C., 2022b. Dietary mixed and sprayed probiotic improves growth performance and digestive enzymes of juvenile whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Journal of Applied Aquaculture*, 35(3), 823-836. DOI:1-14.10.1080/10454438.2022.2032528

Nimrat, S., Tanutpongpalin, P., Sritunyalucksana, K., Boonthai, T. and Vuthiphandchai, V., 2013. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquaculture International*, 21: 655-666. DOI:10.1007/s10499-012-9600-y

Nugroho, R.A. and Fotedar, R., 2013. Dietary organic selenium improves growth, survival and resistance to *Vibrio mimicus* in cultured marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(1):79-85. DOI:10.1016/j.fsi.2013.04.011

Olmos, J. and Paniagua-Michel, J., 2014. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for

aquaculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(7):361-365. DOI:10.4172/1948-5948.1000169

Soundarapandian, P., Ramanan, V. and Dinakaran, G., 2010. Effect of probiotics on the growth and survival of *Penaeus monodon (Fabricius)*. *Current Research Journal of Social Sciences*, 2(2):51-57. DOI:20413246-201003-201009060075-201009060075-51-57

Su, Y., Liu, C., Fang, H. and Zhang, D., 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1):1-12. DOI:10.1186/s12934-020-01436-8

Velasco, M., Lawrence, A.L. and Castille, F.L., 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*, 179(1-4):141-148. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00158-1

Venkat, H.K., Sahu, N.P. and Jain, K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35(5):501-507. DOI:10.1111/j.1365-2109.2004.01045.x

Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1-4):259-264. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.05.035

Yuvaraj, D. and Karthik, R., 2015. Efficacy of probiotics on *Litopenaeus vannamei* culture through zero water exchange system. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(6):445-463. DOI:10.3923/jfas.2015.445.463.

Zhang, P., Zhang, X., Li, J. and Huang, G., 2006. Swimming ability and physiological response to swimming fatigue in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(1): 26-32. DOI:10.1016/j.cbpa.2006.04.014

Zhao, D., Pan, L., Huang, F., Wang, C. and Xu, W., 2016. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(4): 566-576. DOI:10.1111/jwas.12292

Effect of probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 on growth performance and feed efficiency in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in earthen ponds

Ghaednia B.[1*]; Mirbakhsh M.[1]; Pazir M.K.[2]; Bahmani M.[1]; Hafezieh M.[1]

[*]b.ghaednia@areeo.ac.ir

1-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (Areeo), Tehran, Iran

2-Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran

Abstract

The positive performance of beneficial bacteria (probiotics) in promoting aquatic production has been proven, and Bacillaceae family is considered to be one of the most widely used bacteria in aquaculture. This study was conducted to investigate and compare the effect of indigenous probiotic *Bacillus vallismortis* IS03 (JQ085958.1) at 10^{11} CFU kg^{-1} concentration, on the growth performance, feed efficiency, and the amount of harvested biomass of western white shrimp in earthen culture ponds. Two treatments were considered for this purpose: addition of the probiotic to water, addition of the probiotic to feed, and a control group (without the probiotic). The lowest feed conversion ratio was recorded in the water treatment (1.60) and then, in the feed treatment (1.62), which were significantly different from the control group (1.74) during the 100 days of the culture period in ponds with a stocking density of 500,000 per hectare (p<0.05). The percentage of survival in the water treatment (80.72%) and in the feed treatment (80.09%) was recorded, and there was a significant difference between the water treatment and control group (p<0.05). The highest amount of harvested biomass was in the water treatment and then the feed treatment, respectively, and a significant difference was observed with the control (p<0.05). There was no significant difference between the relative and specific growth rates in the treatments and the control (p<0.05). However, the final weight of shrimp at harvest was significantly different in the water treatment compared to the control treatment (p<0.05). Considering the positive and significant effects of the probiotic *B. vallismortis* IS03 in the method of adding to water on the survival rate, harvested biomass, and feed conversion ratio, this bacterium can be suggested as a suitable probiotic to be added to the water of shrimp rearing ponds.

Keywords: Probiotic, Shrimp, *Bacillus vallismortis*, Growth indice, Feed conversion ratio, Biomass

[*]Corresponding author