

بررسی تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های ایمنی‌شناختی همولنف و آنزیم‌های گوارشی بچه شاه‌میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*)

میر آرمان واعظی^{۱*}، ابوالقاسم اسماعیلی فریدونی^۲، رامین مناف‌فر^۳، کوروش امینی^۴

تاریخ دریافت: مهر ۹۶

تاریخ پذیرش: آذر ۹۶

چکیده

در این پژوهش تاثیر چهار سطح از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بچه شاه‌میگوی آب شیرین *Astacus leptodactylus* بر برخی شاخص‌های سیستم ایمنی و آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور بچه شاه‌میگوها با وزن ۱۰ تا ۲۰ گرم، در ۴ گروه تیماری و یک گروه شاهد با سه تکرار در مدت ۸۴ روز تغذیه شدند. سپس از همولنف نمونه‌گیری شد. نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی و آنزیمی همولنف و روده نشان داد که در همه تیمارها و شاهد، بیشترین تا کمترین تعداد هموسیت به ترتیب متعلق به هموسیت‌های نیمه دانه‌دار، دانه‌دار بزرگ و هیالین بود. تعداد کلی هموسیت‌ها، هموسیت‌های نیمه دانه‌دار، دانه‌دار بزرگ و هیالین در تیمارهای حاوی پروبیوتیک افزایش معنادار آماری نشان داد ($P < 0.05$). همچنین سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و فنول اکسیداز در همولنف بچه شاه‌میگو و در مقایسه با گروه شاهد، روند افزایشی و تفاوت معنادار آماری نشان داد ($P < 0.05$). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، آمیلاز و پروتئاز نیز بیانگر تاثیر مثبت افزایشدهنده معنادار پروبیوتیک بر هر سه آنزیم مورد بررسی بود ($P < 0.05$). با توجه به اثر مثبت و چشمگیر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر شاخص‌های ایمنی و گوارشی می‌توان از آن برای بهره‌وری بیشتر در پرورش انبوه شاه‌میگوی جوان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *Astacus leptodactylus*، *Pediococcus acidilactici*، پرو بیوتیک، شاخص‌های ایمنی، آنزیم گوارشی.

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴- استادیار مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان داخلی، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: armanvaezi1396@gmail.com

مقدمه

افزایش پاسخ ایمنی است. این پروبیوتیک‌ها باکتری‌های بی‌ضرر هستند که به سلامت جانور میزبان کمک می‌کنند و به طور مستقیم یا غیرمستقیم به محافظت از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا و مضر باکتریایی کمک می‌کنند. استفاده از پروبیوتیک‌ها در حوزه آبزیان در سال‌های اخیر آغاز شده است، به همین دلیل فلور میکروبی گوارشی موجودات آبزی به خوبی شناخته نشده است و اثرات آن‌ها به طور گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است (Pandiyani et al., 2013).

گروه موثری از پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک (*Lactic Acid Bacteria*) مانند *Enterococcus*، *Lactobacillus* spp. و *Carnobacterium* spp. *faecium* و *Lactococcus* هستند که مطالعات وسیعی بر روی اثر کاربرد آنان در جیره غذایی انجام شده است (Denev et al., 2009). طیفی از انواع باکتریوسین‌ها توسط این نوع باکتری‌ها از جمله سویه‌های *Pediococcus acidilactici* ترشح می‌شود (Bhunja et al., 1990); (Anastasiadou et al., 2008). باکتریوسین‌ها سبب مقاومت گونه‌های آبزیان در برابر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زا

امروزه آبزیان و فرآورده‌های آن‌ها بخش عمده‌ای از نیازهای بشر به غذا را تأمین می‌کنند. در ایران نیز این صنعت به سرعت رو به گسترش است و در حال حاضر چالش عمده در صنعت آبزی‌پروری تجاری بهبود جیره‌های غذایی فرموله برای بهینه‌سازی رشد و ارتقای سلامت ماهیان است. افزایش بهره‌وری در آبزیان با اثرات زیست‌محیطی از جمله ظهور انواع مختلف عوامل بیماری‌زا و مقاومت به باکتری همراه است. این تاثیرات بخشی به دلیل استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی به عنوان یکی از شیوه‌های مدیریت در چرخه‌های تولید است (Balcazar et al., 2006). در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزینی برای روش‌های درمانی قبلی مطرح شده است که به نظر می‌رسد می‌تواند بسیاری از مشکلات را مرتفع سازد (Vazquez et al., 2005). بنابراین، مطالعه در مورد استفاده از پروبیوتیک با افزایش تقاضا برای آبزی‌پروری پایدار سازگار با محیط فزونی یافته است. از جمله مزایای این مکمل‌ها ارزش بهبود یافته خوراک، اشتراک آنزیمی در هضم، مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، فعالیت ضدجهش‌زا و ضدسرطان‌زا و

آمارهای FAO، میزان کل تولید جهانی شاهمیگو تقریباً معادل ۱۵۰ هزار تن در سال بود که از این مقدار رقمی حدود ۳۵ هزار تن از طریق آبی‌پروری تولید شده است (Ackefors, 2000). در سال ۲۰۱۰ میزان تولید آن به بیش از ۶۰۰ هزار تن در دنیا رسیده است (FAO, 2015). صید و برداشت تجاری از ذخایر طبیعی شاهمیگو و صادرات آن به صورت زنده به سایر کشورها در دریاچه پشت سد ارس (توسط یک شرکت ایرانی) از سال ۱۳۷۴ و در تالاب انزلی توسط یک شرکت ترکیه‌ای (شرکت شهلان) از سال ۱۳۷۶ آغاز شد. در حال حاضر کشورهای مختلفی شامل ترکیه (تولید ۱۵۰۰ تن)، ایران (۲۰۰-۱۷۵ تن)، روسیه (تولید ۴۰ تن) و ارمنستان (تولید ۳۰-۲۰ تن) جزء عمده تولیدکنندگان این گونه (با صید و برداشت طبیعی از ذخایر خود) به شمار می‌روند (FAO, 2015).

با توجه به اثرات مخرب فعالیت‌های انسانی در ذخایر آبی طبیعی (صید بی‌رویه، آلودگی‌های صنعتی، شهری و کشاورزی) و همچنین توسعه صنعت آبی‌پروری، توجه ویژه‌ای در سال‌های اخیر به تکثیر مصنوعی و پرورش این گونه (به عنوان یکی از آبزیان پرسود آب‌های شیرین) در برخی از کشورهای آسیایی، اروپایی و آمریکایی

می‌شوند. از این گونه به عنوان مکمل پروبیوتیکی در جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (Merrifield et al., 2010a; Merrifield et al., 2010b) گربه‌ماهی کانالی (Shelby et al., 2007) نیل (Zhou et al., 2010) و میگوهای *Litopenaeus stylirostris* (Castex et al., 2008; Castex et al., 2009) و میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei* (Ahmadi et al., 2014) استفاده شده است.

شاهمیگوی (خرچنگ دراز) آب شیرین (Crayfish) نوعی میگوی آب شیرین از راسته ده‌پایان (Decapoda)، رده سخت‌پوستان (Crustaceae) و از خانواده Astacidae با نام علمی *Astacus leptodactylus* است که عمدتاً در تالاب انزلی، مصب رودخانه‌های جنوبی دریای خزر و دریاچه پشت سد ارس پراکنده شده است. شاهمیگوی آب شیرین نخستین بار در سال ۱۹۶۴ توسط Veladykov در سواحل ایرانی دریای خزر با دو گونه *Astacus leptodactylus* و *Astacus pachypus* گزارش شد که بعداً توسط پژوهشگران دیگر حضور تنها یک گونه *Astacus leptodactylus* مورد تایید قرار گرفت (Valipour et al., 2011). بر اساس

در *(Macrobrachium rosenbergii)* استخرهای آزمایشی در طی ماه‌های گرم سال (با تولید ۴۰۰-۵۰۰ کیلوگرم شاه‌میگو در هر هکتار) گزارش شد (FAO, 2015). در اکثر این مطالعات، میزان بازماندگی بچه شاه‌میگوها (مینیاتور) در محدوده کمتر از ۱۰ درصد عنوان شده است. در این میان می‌توان دلایل متعددی مانند عوامل زیست‌شناختی، تغذیه، رفتار و عملکرد تولیدمثلی را برای توجیه احتمالی علت بازماندگی پایین بچه شاه‌میگوها در استخرهای آبزی‌پروری پیش‌بینی کرد که یکی از موارد بسیار مهم را می‌توان به اهمیت تاثیر تغذیه به ویژه با ترکیباتی مانند پروبیوتیک‌ها نسبت داد. از آنجا که تا کنون مطالعه در زمینه استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بچه شاه‌میگوی آب شیرین پرورشی انجام نشده است. پژوهش حاضر برای اولین بار در این زمینه انجام شد تا نتایج به دست آمده از آن بتواند در تصمیم‌گیری‌های مدیریتی شیلاتی، بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد و ارتقا سلامتی از جنبه سیستم ایمنی و مجاری دستگاه گوارشی شاه‌میگوی آب شیرین موثر واقع شود.

شده است (FAO, 2015). در این راستا مطالعات متعددی در زمینه زیست‌شناسی، تکثیر مصنوعی، رشد لاروی و پرورش شاه‌میگو در استخرهای پرورشی صورت گرفته که نهایتاً می‌تواند نقش مهمی در افزایش میزان بازده تولید آبزی‌پروری و همچنین بازسازی ذخایر آن در طبیعت ایفا کند (Tcherkashina, 1977; Koksal, 1988; Lowery, 1988; Ackefors et al., 1989). برخی از ویژگی‌های مهم شامل رشد سریع، سازگاری بالا به عوامل محیطی و نوسانات فصول مختلف سال در کنار مقاومت به انواع بیماری‌ها باعث شده است که این گونه به عنوان یک گزینه مناسب برای آبزی‌پروری توام در آب‌های شیرین محسوب شود (Hoffman, 1980; Koksal, 1988; Ackefors, 1989).

در سال‌های اخیر نیز مطالعات متعددی در زمینه پرورش توام شاه‌میگوی آب شیرین با ماهیان غیرشکارچی (مانند کپورماهیان) و یا ماهیان شکارچی (در حد نارس و یا انگشت‌قد) انجام شده است (Zaikov, 2010). نتایج موفقیت‌آمیزی از کشت توام شاه‌میگوی آب شیرین با ماهیان انگشت‌قد گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) و میگوی آب شیرین

مواد و روش‌ها

در تمام مخازن از لوله پولیکا برای پناهگاه به تعداد بچه شاهمیگوها پرورشی استفاده شد. منبع آب از آب چاه تامین شد. آزمایش در ۴ گروه تیمار و یک گروه شاهد با سه تکرار در مدت ۸۴ روز صورت گرفت. در انتهای دوره آزمایش نمونه برداری از همولنف به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی و آنزیمی همولنف و آنزیم‌های روده میگو انجام شد (Valipour et al., 2011).

به منظور آماده‌سازی ترکیب جیره غذایی ابتدا محتویات اولیه جیره شامل پودر ماهی، آرد گندم، آرد سویا، روغن ماهی، ژلاتین، مخلوط ویتامین و مواد معدنی همراه با دیگر محتویات جیره به مقدار مناسب تهیه شد. فرمول و ترکیب غذایی در جدول ۱ ارائه شده است.

جیره پایه با افزودن باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در چهار سطح غنی‌سازی شده آماده شد تا جیره‌های آزمایشی مورد نظر به دست آید. پروبیوتیک *P. acidilactici* به صورت تجاری (Bactocell Lallemand Animal Nutrition, PA 10 S.A., فرانسه) تهیه شد که حاوی سلول‌های زنده باکتری مذکور بود. برای افزودن پروبیوتیک به جیره‌های غذایی از ۲ درصد روغن ماهی به

بچه شاهمیگوهای آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) با وزن ۱۰ تا ۲۰ گرم از دریاچه پشت سد ارس صید شد و به محل انجام آزمایش در ایستگاه تخصصی مرکز تحقیقات ذخایر آب‌های داخلی (گرگان) انتقال یافت. یک هفته پس از انتقال به استرس‌زدایی و سازگاری با محیط آزمایش سپری شد. در این پژوهش از ۱۵ مخزن ۱۲۰ لیتری مدور هر کدام مجهز به هوادهی دائمی استفاده شد. ۶ عدد بچه شاهمیگوی ۱۰ تا ۲۰ گرمی بعد از زیست‌سنجی به صورت کاملاً تصادفی در هر مخزن قرار گرفت. اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب شامل دما و pH (WTW Weilheim, pH 330i, آلمان) و اکسیژن محلول (Weilheim, WTW Oxi 330i, آلمان) با دقت ۰/۰۱ به طور روزانه در طول دوره پرورش اندازه‌گیری و ثابت نگه داشته شدند (دما $25/86 \pm 0/95$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن $7/24 \pm 0/046$ میلی‌گرم بر لیتر و pH $7/78 \pm 0/014$). به منظور حفظ کیفیت آب مخازن در طول دوره پرورش، هر ۲ روز یک‌بار ۲۵ درصد از آب آن‌ها تعویض شد. بچه شاهمیگوها روزانه به میزان ۳ درصد از وزن بدن و در ۲ نوبت طی دوره آزمایش غذادهی شدند.

عنوان حامل استفاده شد (اسدی و همکاران، کدام در ۳ تکرار) به همراه یک تیمار جیره (۱۳۹۶). جیره‌های آزمایشی شامل ۴ تیمار (هر شاهد مطابق جدول ۲ طراحی شد).

جدول ۱: نوع و مقدار مصرف مواد خوراکی در جیره پایه (شاهد)*

ماده خوراکی	مقدار در جیره (درصد)
ژلاتین	۱۱/۹۱
نشاسته	۷/۱۳
آرد گندم	۵/۲۴
آرد ذرت	۱۰
آرد ماهی	۳۴
آرد سویا	۴/۵
سلولز	۱۴/۱۳
روغن ذرت	۳/۸۹
روغن ماهی	۴
مخلوط ویتامینی**	۲
مخلوط معدنی***	۲
آنتی اکسیدان	۰/۲
ویتامین C	۱
آنالیز تقریبی	
پروتئین خام	۴۰
چربی خام	۱۲
کربوهیدرات	۲۰
رطوبت	۷/۷۹
خاکستر	۵/۳۱
فیبر	۱/۱۲
انرژی خام kcal/kg	۴۰۰

*: ترکیب و مقدار مصرف تمام مواد خوراکی به غیر از سلولز در جیره‌های آزمایشی دیگر مشابه جیره پایه است.
 **: مخلوط ویتامینی (گرم/کیلوگرم): ویتامین A، ۱۰۶۰۰۰۰۰ IU؛ ویتامین D_۳، ۴۰۰۰۰۰۰ IU؛ ویتامین E ۴۰ گرم؛
 ویتامین K_۳ ۲ گرم؛ ویتامین B_۱ ۶ گرم؛ ویتامین B_۲ ۸ گرم؛ ویتامین B_۳ ۱۲ گرم؛ ویتامین B_۵ ۴۰ گرم؛ ویتامین B_۶ ۴

گرم؛ ویتامین B_۹ ۲ گرم؛ ویتامین B_{۱۲} ۸ گرم؛ ویتامین H_۲ ۰/۲۴ گرم؛ ویتامین C ۶۰ گرم؛ اینوزیتول ۲۰ گرم؛ بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (Butylated Hydroxy Toluene) ۲۰ گرم.
 ***: مخلوط مواد معدنی (گرم/کیلوگرم): NaCl، ۲/۸ گرم؛ MnSO_۴·H_۲O، ۶/۵ گرم؛ FeSO_۴·۷H_۲O، ۲۰ گرم؛ CuSO_۴·۵H_۲O، ۵/۵ گرم؛ Na_۲SeO_۳، ۰/۱ گرم؛ MgSO_۴·۷H_۲O، ۲۸۳/۹۸ گرم؛ ZnSO_۴·۷H_۲O، ۱۳۱/۹۳ گرم؛ KI، ۰/۴۰ گرم؛ CoCl_۲·۶H_۲O، ۱۲ گرم.

جدول ۲: غلظت‌های مورد استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در تیمارهای مختلف

تیمارها	غلظت پروبیوتیک <i>Pediococcus acidilactici</i>
تیمار ۱	جیره پایه بدون پروبیوتیک (شاهد)
تیمار ۲	جیره پایه غنی شده با ۱ × ۱۰ ^۹ CFU/g
تیمار ۳	جیره پایه غنی شده با ۲ × ۱۰ ^۹ CFU/g
تیمار ۴	جیره پایه غنی شده با ۳ × ۱۰ ^۹ CFU/g
تیمار ۵	جیره پایه غنی شده با ۴ × ۱۰ ^۹ CFU/g

در انتهای دوره آزمایش نمونه‌برداری از همولنف به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی و آنزیمی همولنف و آنزیم‌های روده میگو انجام شد (Valipour et al., 2011).

اندازه‌گیری شاخص‌های همولنف

فنل اکسیداز^۱ استفاده شد (محلول A). باقی مانده همولنف (۲۰۰ میکرولیتر) در میکروتیوب‌های حاوی ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول ضدانعقاد آرزویر^۲ (حاوی ۱۱۵ میلی‌مول گلوکز، ۳۳۶ میلی‌مول سدیم کلرید، ۲۷ میلی‌مول سیترات سدیم و ۹ میلی‌مول اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید^۳ با pH ۷) ذخیره شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون برای تعیین تعداد هموسیت (سلول‌های خونی) کل^۴ و شمارش افتراقی هموسیت‌ها^۵ استفاده شد

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی همولنف ۳۰۰ میکرولیتر همولنف با استفاده از سر سوزن G۲۵ و سرنگ یک میلی‌لیتری از سینوس شکمی هر بچه شاهمیگو خارج شد (شکل ۱). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از همولنف در میکروتیوب‌های یک میلی‌لیتری بدون محلول ضدانعقاد ذخیره شد. از این سوسپانسیون برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

- 1- Phenoloxidase
- 2- Alsever
- 3- EDTA
- 4- Total Hemocyte Count
- 5- Differential Hemocyte Count

سنجش آنزیم فنل اکسیداز به روش اسپکتروفوتومتری (R 5000™ UV-Vis Spectrophotometer, Hach, آمریکا) و به کمک ثبت تشکیل دوپاکروم^۲ از L-دی‌هیدروکسی فنیل آلانین^۳ انجام گرفت (Hernandez-Lopez et al., 1996). سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش اسپکتروفوتومتری از طریق سنجش مهار احیای فری‌سیتوکروم C^۴ در طول موج ۵۵۰ نانومتر انجام گرفت (Cooper et al., 2002).

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی

پس از کالبدشکافی، هپاتوپانکراس خارج و توسط آب مقطر شستشو شد. سپس توسط دستمال کاغذی خشک شد. هر ۳۰ گرم از نمونه هپاتوپانکراس با ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و توسط دستگاه هموژنایزر (UP400St, Hielscher, آلمان) عمل یکنواخت‌سازی انجام گرفت. مخلوط به دست آمده در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در انتها مایع تجمع یافته در قسمت بالای نمونه‌ها که حاوی

(محلول B). سوسپانسیون باقی مانده (۱۰۰ میکرولیتر) در سانتریفیوژ (MultiSPIN Refrigerated Benchtop Centrifuge, Cleaver Scientific، انگلستان) با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت تا هموسیت‌ها از پلاسما جدا شود. سپس از مایع رویی انباشته شده برای تعیین آنزیم‌های پلاسما استفاده شد (محلول C).

برای سنجش تعداد هموسیت کل ۵۰ میکرولیتر از محلول B بر روی لام هموسیتومتر^۱ قرار داده شد و تعداد هموسیت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد (Jiang et al., 2004). به منظور تعیین تابلوی هموسیتی یا شمارش افتراقی هموسیت‌ها از روش Pousti و Adib Moradi (2004) استفاده شد.



شکل ۱: نحوه برداشت مایع همولنف از سینوس شکمی بچه شاه‌میگو

- 2- Dopachrome
- 3- L-dihydroxy Phenylalanine (L-DOPA)
- 4- Ferricytochrome c

- 1- Hemocytometer

از آزمون من-ویتنی در سطح اطمینان ۹۵٪ مشخص شد. نرم‌افزار آماری SPSS 19 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 برای رسم نمودارها به کار برده شدند.

نتایج

شاخص‌های ایمنی و آنزیمی همولنف

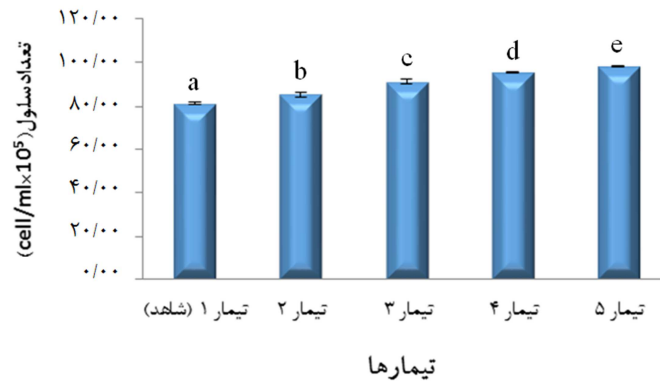
نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های ایمنی همولنف استخراج شده از بچه شاهمیگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) پس از دوره تغذیه با غلظت‌های متفاوت جیره دارای پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* نشان داد که شاخص تعداد کلی هموسیت در همه تیمارها افزایش معناداری را همراه با افزایش غلظت پروبیوتیک جیره نشان داد (شکل ۲). همین روند در شاخص‌های تعداد هموسیت‌های دانه‌دار، نیمه دانه‌دار و هیالین به طور کاملاً مشابه مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۴ و ۵).
سنجش فعالیت آنزیمی بچه شاهمیگوهای شاهد نشان داد که فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در بچه شاهمیگوهای تغذیه شده با همه جیره‌های حاوی پروبیوتیک افزایش معناداری یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در تیمار ۳ و کمترین آن در شاهد

پروتئین‌های محلول بود برای سنجش تغییرات آنزیمی، در نیتروژن مایع ذخیره شد. سنجش آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز به روش اسپکتروفتومتری و به ترتیب در طول موج‌های ۵۵۰ ، ۵۴۰ ، ۳۶۶ نانومتر و به ترتیب با استفاده از دستور العمل‌های Coccia و همکاران (۲۰۱۱)، Lopez-Lopez و همکاران (۲۰۰۳) و Fernandez Gimenez و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت.

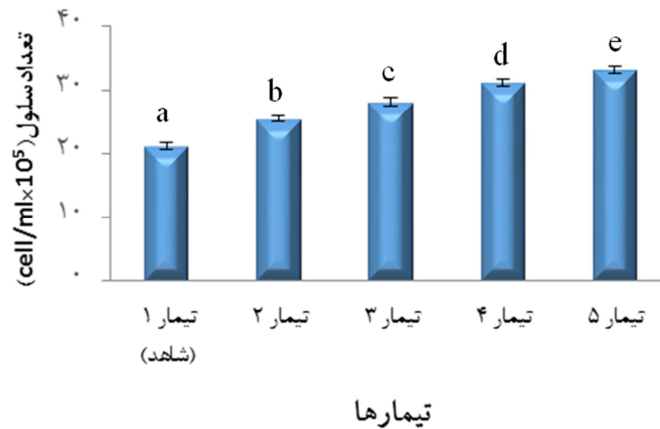
تجزیه و تحلیل آماری

مطالعه حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely Randomized Design (CRD) در سه تکرار برای هر تیمار و شاهد انجام شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و بررسی همگنی گروه‌ها با آزمون Levene انجام پذیرفت. در صورت همگن بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین تیمارهای تغذیه‌ای از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. برای داده‌های غیرهمگن از آزمون غیرپارامتریک کروسکال-والیس استفاده شد و معنی‌دار بودن گروه‌های مورد بررسی با استفاده

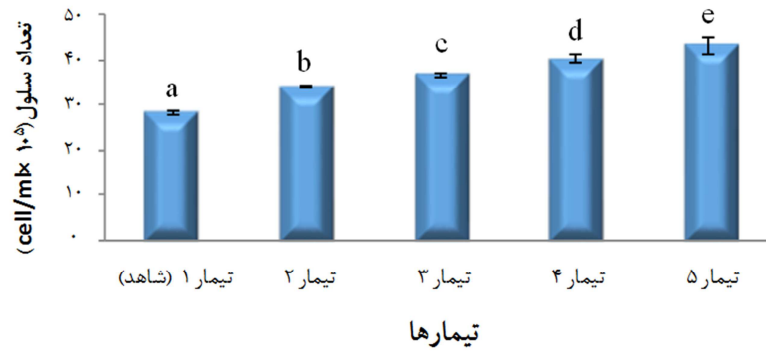
مشاهده شد (شکل ۶). همچنین سنجش فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که کلیه تیمارهای مورد بررسی نسبت به شاهد افزایش معناداری را در فعالیت این آنزیم تجربه کردند و بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار ۲ و کمترین آن در گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۷).



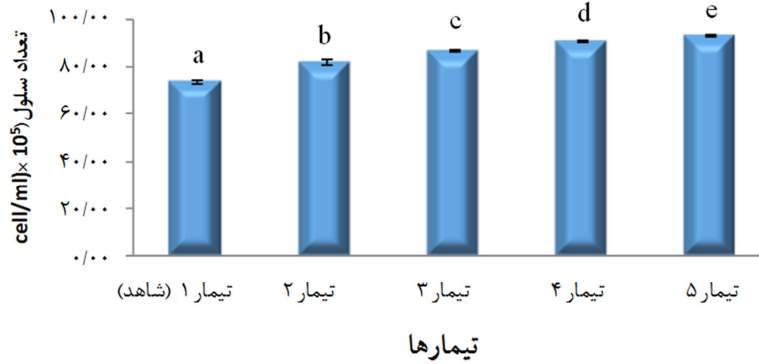
شکل ۲: تعداد کل هموسیت‌های بچه شاه‌میگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



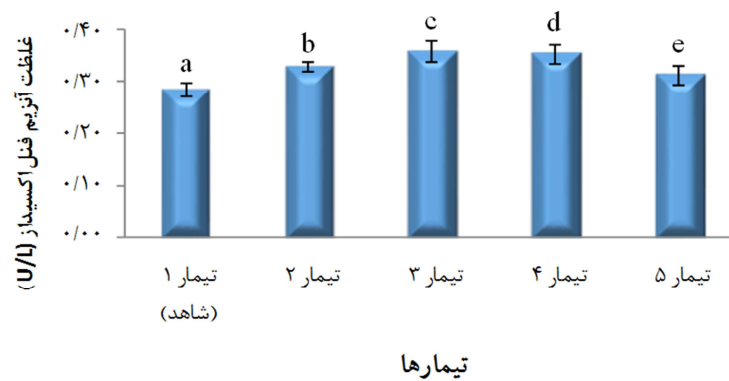
شکل ۳: هموسیت هیالین بچه شاه‌میگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



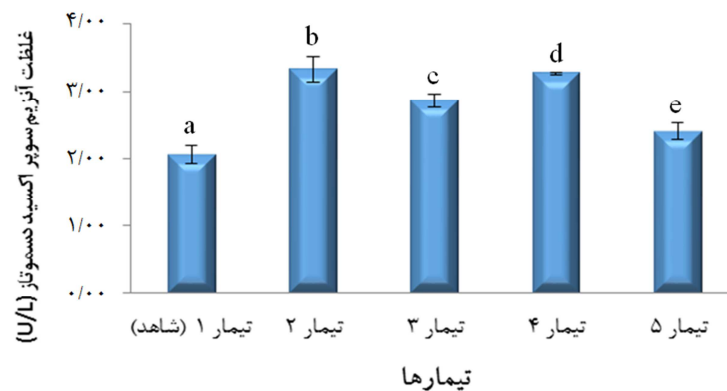
شکل ۴: هموسیت‌های نیمه دانه‌دار بچه شاه‌میگو در پایان دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



شکل ۵: هموسیت دانه‌دار بزرگ بچه شاه‌میگو در پایان دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



شکل ۶: فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بچه شاه‌میگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.

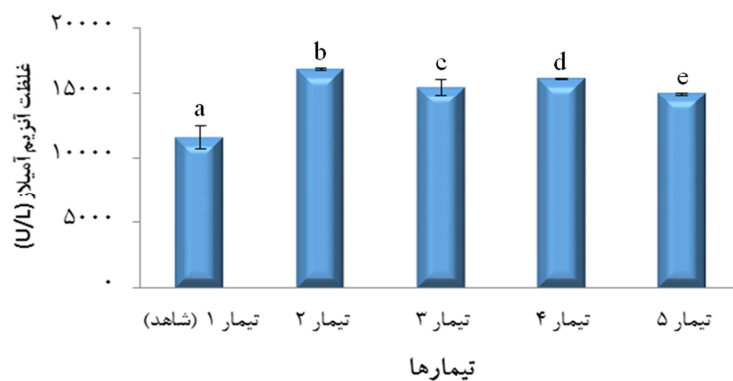


شکل ۷: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در همولنف بچه شاه‌میگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.

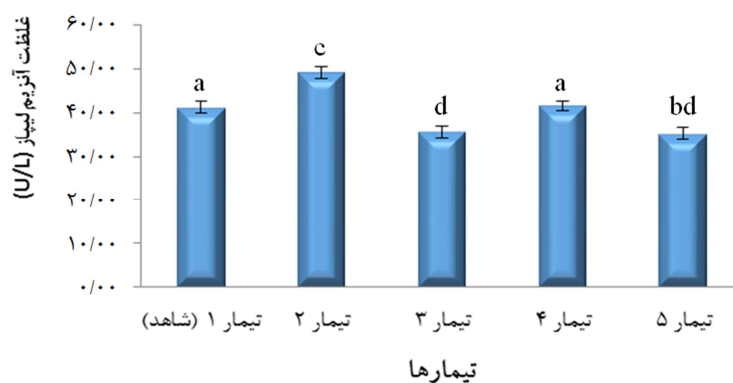
تیمارها با هم و با نمونه شاهد مشاهده شد. تنها در بررسی فعالیت آنزیم لیپاز مشاهده شد که تیمار ۳ و ۵، همچنین تیمار ۴ و شاهد (تیمار ۱) تفاوت معنادار آماری نداشتند.

نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی با سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در پایان دوره آزمایش، در بیشتر موارد اختلاف معنی‌دار بین همه

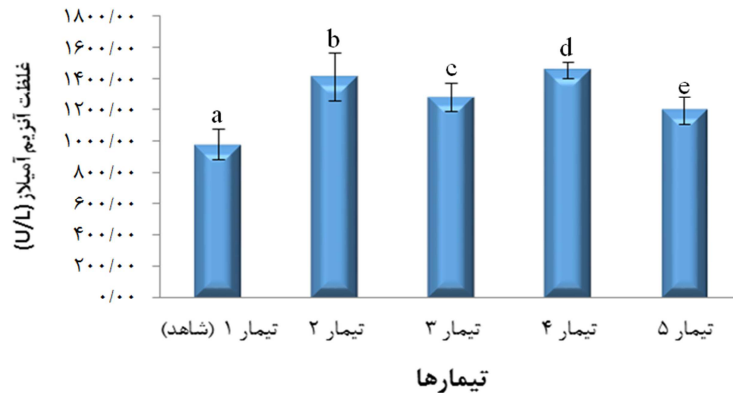
بیشترین فعالیت آنزیم آمیلاز در تیمار ۲ و ۴ و شاهد و بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز در کمترین آن در تیمار شاهد، بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار ۲ و کمترین آن در تیمار ۴ و ۵ (شکل‌های ۸، ۹ و ۱۰).



شکل ۸: فعالیت آنزیم آمیلاز در همولنف بچه شاهمیگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



شکل ۹: فعالیت آنزیم لیپاز در همولنف بچه شاهمیگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.



شکل ۱۰: فعالیت آنزیم پروتئاز در همولنف بچه شاهمیگو پس از پایان دوره آزمایش (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری معنادار است.

بحث

هموسیت‌ها در شاهمیگوی آب شیرین همانند سایر سخت‌پوستان نقش مهمی را در پاسخ‌های ایمنی میزبان ایفا می‌کنند (Jiravanichpaisal et al., 2006). در این مطالعه بیشترین تعداد هموسیت‌ها به ترتیب مربوط به هموسیت‌های نیمه دانه‌دار، دانه‌دار بزرگ و هیالین بود. مطالعات متعددی نیز غالب بودن هموسیت‌های نیمه دانه‌دار را در همولنف میگوی آب شیرین تایید می‌کند. در مطالعه‌ای که بر هموسیت همین گونه *Astacus leptodactylus* انجام شد نیز بیشترین و کمترین تراکم سلولی همولنف به ترتیب مربوط به هموسیت‌های نیمه دانه‌دار و هیالین بود (Samnejhad et al., 2016). همچنین مطالعه هموسیت‌های

مطالعات متعددی در سال‌های اخیر نقش مفید پروبیوتیک‌ها را در تغذیه و همچنین تاثیر حفاظتی آن‌ها در برابر عوامل پاتوژن مشخص کرده‌اند (Yanbo and Zirong, 2006). در مطالعه حاضر افزودن پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به جیره غذایی بچه شاهمیگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) به افزایش چشمگیر شاخص‌های ایمنی همولنف و آنزیم‌های گوارشی منجر شد که این افزایش به ویژه در مورد شاخص هموسیت در همولنف قابل توجه بود و بیشترین افزایش با روندی صعودی در بالاترین غلظت پروبیوتیک (تیمار ۵) مشاهده شد. مطالعات نشان می‌دهند که

سخت‌پوستان نقش ایفا می‌کنند (Gillespie et al., 1997; Soderhall and Cerenius, 1998; Sritunyalucksana and Soderhall, 2000). بنابراین با افزایش قابل توجه در تعداد هموسیت‌های کل شاهمیگوی آب شیرین می‌توان نتیجه گرفت که سیستم ایمنی این گونه نیز در تغذیه با پروبیوتیک *P. acidilactici* قدرت بیشتری یافته است. اثرات مثبت استفاده از این پروبیوتیک بر رشد و بازماندگی، سیستم خونی و ایمنی میگوها و ماهیان نیز در پژوهش‌های مختلفی ثابت شده است (حسینی مدنی و همکاران، ۱۳۹۳؛ Ahmadi; Ferguson et al., 2010; et al., 2014). به منظور مطالعه دقیق‌تر تاثیر این پروبیوتیک بر سیستم ایمنی شاهمیگوی آب شیرین، بررسی سطح فعالیت آنزیم‌های فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نیز انجام شد. زمانی که واکنش دفاعی سلولی آغاز می‌شود، عمل ملانیزیشن (تولید رنگدانه) رخ می‌دهد. آنزیم فنل اکسیداز که در تولید رنگدانه ملانین نقش دارد، در ابتدا به صورت غیرفعال به نام پروفنول اکسیداز در داخل همولنف وجود دارد. سرین پروتئاز باعث تبدیل پروفنولوکسیداز غیرفعال به فنل اکسیداز که یک آنزیم حیاتی برای سیستم ایمنی است،

کل در سیستم ایمنی شاهمیگوی آب شیرین نیز یافته‌های مطالعه حاضر را تایید می‌کند (سام‌نژاد و افشارنسب، ۱۳۹۵). در مطالعه حاضر پس از گذشت زمان افزایش معنادار چشمگیری در تعداد انواع مختلف سلول‌های هموسیت اتفاق افتاد. این افزایش معنادار در همه تیمارها مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده اثر بسیار مثبت پروبیوتیک *P. acidilactici* بر سیستم همولنف بچه شاهمیگوی آب شیرین باشد. در شاهمیگوها سلول‌های هیالین مسئول روند فاگوسیتوز (بیگانه‌خواری) هستند. سلول‌های نیمه دانه‌دار اساساً در روند کپسوله کردن میکروارگانیسم‌های مهاجم شرکت می‌کنند و همچنین سلول‌های دانه‌دار بزرگ به عنوان ذخیره اصلی در فعالیت‌های سیستم پروفنل اکسیداز عمل می‌کنند (Johansson et al., 2006; Jiravanichpaisal et al., 2006). مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های نیمه دانه‌دار و دانه‌دار در پاسخ به عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل مولکولی مانند پپتیدوگلیکان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در دیواره باکتری‌ها با آزاد کردن ترکیبات سیستم پروفنل اکسیداز آمین (با تولید ملانین، چسبندگی سلولی، کپسوله کردن و روند فاگوسیتوز) در واکنش‌های همورال و سیستم دفاعی بی‌مهرگانی مانند

می‌شناسند (Van De Braak et al., 2002; Alday-Sanz, 2010). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که سطح فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در تیمار با کمترین غلظت پروبیوتیک تا بالاترین غلظت، افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد داشت. با توجه به افزایش معنادار هموسیت‌های مختلف، افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها دور از انتظار نبود. نتایج مطالعه بر ایجاد و توزیع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در همولنف خرچنگ *Carcinus maenas* نشان داده است که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هم در هموسیت هیالین و هم در هموسیت‌های دانه‌دار دیده شد و احتمالاً این آنزیم که در همولنف وجود دارد، در محافظت از بافت میزبان در برابر آسیب اکسیداتیو در طول فرآیند طبیعی دفاع کمک کند. در مطالعه‌ای که به بررسی تاثیر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر دفاع آنتی‌اکسیدانی و وضعیت استرس اکسیداتیو در میگوی *Litopenaeus stylirostris* پرداخته است، سطوح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در همولنف و غدد گوارشی این میگو پس از تغذیه با جیره غنی شده با این پروبیوتیک، گزارش شد (Castex et al., 2009). این نتایج در میگوهای جوان *Penaeus monodon* که به مدت ۷ هفته با می‌شود (Sang, 2010). همچنین آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد است. این آنزیم، واکنش تبدیل دو رادیکال آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی را سرعت می‌بخشد و بنابراین باعث جمع‌آوری رادیکال‌های مضر مذکور می‌شود. به این ترتیب آبزیان در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌شوند (Fridovich, 1974). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تمام بافت‌های هوازی وجود دارد و جایگاه سلولی آن داخل سیتوزول و میتوکندری است (Sun et al., 1988). همان طور که گفته شد هموسیت‌های نیمه دانه‌دار در اعمال مسمومیت سلولی و سیستم فعال کننده پروفنول اکسیداز هم نقش دارند. سلول‌های دانه‌دار گرانول‌هایی در سیتوپلاسم خود دارند و بزرگترین نوع هموسیت هستند که در فاگوسیتوز نقشی ندارند و در واکنش‌های تشکیل کپسول و ندول نقش محدودی دارند. در عوض در مسمومیت سلولی فعال هستند و در فعال کردن سیستم فعال کننده فنول اکسیداز نقش عمده‌ای دارند. به همین دلیل هموسیت‌های دانه‌دار را به عنوان مخزن سیستم فعال کننده فنول اکسیداز

افزایش توانایی ایمنی در *Litopenaeus vannamei* شود. آن‌ها پاسخ‌های سلولی و هومورال افزایش یافته از قبیل افزایش فعالیت فنول اکسیداز و فعالیت سوپراکسیداز را در مقابل عوامل بیماری‌زا پس از تغذیه با پروبیوتیک در میگوی وانامی گزارش کردند. این بررسی ثابت کرد که وقتی پروبیوتیک در جیره غذایی استفاده می‌شود، انفجار تنفسی^۱ (انتشار سریع گونه‌های اکسیژن واکنشی مانند رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن) در انواع مختلف سلول‌های همولنف میگو را از طریق افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پروکسی نکتین، کاهش می‌دهد (Chiu et al., 2007).

در بررسی آنزیم‌های گوارشی شاه‌میگوی آب شیرین پس از دوره تغذیه با جیره غذایی غنی شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* مشخص شد که وجود این پروبیوتیک بر عملکرد آنزیم‌های گوارشی بچه شاه‌میگو نیز اثر افزایشی و مثبت داشته است. به طوری که در کلیه تیمارها افزایش معنادار فعالیت آنزیم‌های گوارشی دیده شد. اما بیشترین افزایش در خصوص آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز در تیمار ۲ با کمترین غلظت پروبیوتیک (*P. acidilactici*)

جیره غذایی غنی شده با آستاگزانتین تغذیه شده بودند نیز مشاهده شد (Pan et al., 2003). با توجه به این نتایج می‌توان این چنین برداشت کرد که تغذیه با پروبیوتیک می‌تواند سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (Castex et al., 2008). به عبارتی دیگر جیره غذایی دارای پروبیوتیک (از گروه باکتری‌های اسیدلاکتیکی) مصرف غذا را بهبود می‌بخشد، در افزایش جذب و ترکیب آنتی‌اکسیدان‌های موجود در غذا همکاری می‌کند و یا در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش ایفا می‌کند (Kullisaar et al., 2002). این پژوهشگران این فرضیه را مطرح می‌کنند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها ممکن است به عنوان مکانیسم‌های دفاعی در محیط میکروبی روده به کارگرفته شود و بنابراین به سرکوبی استرس‌های اکسیداتیو با منشا داخلی و خارجی کمک می‌کند. مطالعات دیگری نیز با استفاده از روش‌های مولکولی، تاثیر مثبت بر فعالیت سیستم ایمنی در حضور پروبیوتیک *P. acidilactici* و تغییر در فلور میکروبی روده میگوها را گزارش کردند (Castex et al., 2006; Chiu et al., 2008). همکاران (2007) بیان کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند منجر به ایجاد تحول و

1- Respiratory Burst

استفاده در مطالعه حاضر (*P. acidilactici*) بر رشد و بازماندگی و آنزیم‌های گوارشی میگوی *L. vannamei* پرداخته است، نیز مشخص شد که این پروبیوتیک اثرات شاخص افزایش‌دهی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی وانامی نیز داشته است که موید نتایج مطالعه حاضر است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها ممکن است از طریق تولید ویتامین‌ها، کوفاکتورها و یا بهبود فعالیت خود آنزیم‌ها، فعالیت گوارشی آن‌ها را ارتقا بخشند (Gatesoupe, 1999). ذکر این نکته لازم است که Moriarty (۱۹۹۸) معتقد است که باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های جنس *Bacillus* طیف وسیعی از آنزیم‌های خارجی را ترشح می‌کند. احتمال دارد که نرخ پایین افزایش فعالیت آنزیم‌ها در مطالعه حاضر به دلیل استفاده از جنس *Pediococcus* باشد. در حقیقت تمایز بین افزایش فعالیت به دلیل ساخت آنزیم بیشتر توسط خود میگو با ساخت آنزیم توسط کلونی پروبیوتیک ایجاد شده در مجاری گوارشی میگو کمی دشوار است. اگرچه آنزیم‌های خارجی تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها تنها سهم کمی در فعالیت کل آنزیم دارد (Ziaei-Nejad et al., 2006).

با غلظت 1×10^9 CFU/g و کمترین میزان این آنزیم‌ها در گروه شاهد مشاهده شد. در بررسی میزان آنزیم پروتئاز در تیمار ۴ (*P. acidilactici*) با غلظت 3×10^9 CFU/g با تفاوتی کمی نسبت به تیمار ۲ بیشترین افزایش فعالیت مشاهده شد. بنابراین در دیدگاه کلی با وجود تاثیر مثبت پروبیوتیک بر آنزیم‌های گوارشی در کلیه تیمارها، تیمار ۲ با کمترین غلظت پروبیوتیک تاثیر افزایش‌دهنده بیشتری بر فعالیت این آنزیم‌ها ایفا کرد. در بررسی اثر پروبیوتیک *Bacillus subtilis* بر میگوی *L. vannamei* نیز همین اثرات کاملا مشخص بود و اثر افزایش‌دهنده بر آنزیم‌های گوارشی مشاهده شد (Zokaeifar et al., 2012). در بررسی عملکرد رشد، فعالیت آنزیم گوارشی و پاسخ ایمنی *Macrobrachium rosenbergii* تغذیه شده با پروبیوتیک *Clostridium butyricum* نیز نتایج کاملا مشابه از افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، پروتئاز و آمیلاز مشاهده شد (Sumon et al., 2018). در مطالعه‌ای که بر تاثیر پروبیوتیک‌های ترکیبی بر آنزیم‌های گوارشی *Penaeus vannamei* توسط Wang در سال ۲۰۰۷ انجام شد، افزایش چشمگیر آنزیم‌های گوارشی گزارش شد. در بررسی که به تاثیر پروبیوتیک مورد

در بیان یک نتیجه کلی از بررسی اثر جیره‌های با غلظت‌ها متفاوت از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در تغذیه بچه شاه‌میگوی آب شیرین پس از ۸۴ روز، مشخص شد که استفاده از این مکمل می‌تواند اثرات مثبت قابل توجهی بر شاخص‌های ایمنی همولنف مانند تعداد انواع سلول‌های هموسیت هیالین، هموسیت نیمه دانه‌دار و دانه‌دار بزرگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و فنول اکسیداز داشته باشد. تاثیر مثبت استفاده از این پرو بیوتیک بر آنزیم‌های گوارشی بچه شاه‌میگوی آب شیرین نیز با توجه به نتایج این مطالعه کاملاً آشکار است.

منابع

- نیاز برای پرورش ماهی زینتی گرین ترور
(*Andinocara rivulatus*). فصلنامه محیط
زیست جانوری، ۶(۴): ۷۷-۸۴.
- سام‌نژاد آ. و افشارنسب م. ۱۳۹۵. مطالعه
هموسیت‌های کل و پروتئین کل پلاسمای
همولنف در سیستم ایمنی شاه‌میگوی آب
شیرین (*Astacus leptodactylus*). مجله
علوم و فنون دریایی، ۱۵(۱): ۴۹-۵۸.
- Ackefors H. 1989.** Intensification of
European freshwater crayfish
culture in Europe. Special session
on crayfish culture of Aquaculture
1989, World Aquaculture Society,
USA. 29P.
- Ackefors H., Gydemo R. and
Westin L. 1989.** Growth and
survival of juvenile crayfish,
Astacus astacus, in relation to
food and density. In: De Pauw N.,
Jaspers E., Ackefors H. and
Wilkins N. (Eds.). P: 365-373.
Aquaculture Biotechnology in
Progress. European Aquaculture
Society, Belgium.
- Ackefors H.E.G. 2000.** Freshwater
crayfish farming technology in the
1990s: A European and global
perspective. Fish and Fisheries, 1:
337-359.
- Ahmadi S., Soltani M., Shamsaie
M., Rajabi Islami H. and
Peyghan R. 2014.** Comparative
effect of *Pediococcus acidilactici*
as probiotic and vitamin C on
survival, growth performance and
enzyme activities of white leg
shrimp (*Litopenaeus vannamei*).
Journal of Animal and Veterinary
Advances, 13(14), 877-885.
- Alday-Sanz V. 2010.** The Shrimp
Book. Nottingham University
Press, UK. 899P.
- Anastasiadou S., Papagianni M.,
Filiouisis G., Ambrosiadis I. and
Koidis P. 2008.** Pediocin SA-1 an
antimicrobial peptide from
Pediococcus acidilactici NRRL
B5627: Production conditions,
purification and characterization.
Journal of Bioresource
Technology, 99(13): 5384-5390.
- Balcazar J.L., Blas I.D., Ruiz-Zarzue
I., Cunningham D., Vendrell D.
and Muzquiz J.L. 2006.** The role
of probiotics in aquaculture.
Veterinary Microbiology, 31:
114(3-4): 173-86.
- اسدی خمام س.، مورکی ن. و ولیپور ع. ۱۳۹۶.
تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*
بر رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی سیم
Abramis brama orientalis مجله علوم و
فنون شیلات، ۶(۱): ۱-۱۲.
- حسینی مدنی ن.س.، مورکی ن.، انوار ا. و
منوچهری ح. ۱۳۹۳. فرمولاسیون جیره بهینه
با تاکید بر تعیین سطح ایتیمم پروتئین مورد

- Bhunia A.K., Johnson M.C., Ray B. and Belden E.L. 1990.** Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(2): 211–215.
- Castex M., Chim L., Pham D., Lemaire P., Wabete N., Nicolas J.L., Schmidely P. and Mariojouis C. 2008.** Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275(1-4): 182–193.
- Castex M., Chim L., Wabete N., Lemaire P. and Usache V. 2006.** Feeding evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) in sub adult shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Microbial, nutritional and zootechnical aspects. WAS Annual Meeting, Firenze, Italia.
- Castex M., Lemaire P., Wabete N. and Chim L. 2009.** Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 294(3-4): 306–313.
- Chiu C.H., Guu Y.K., Liu C.H., Pan T.M. and Cheng W. 2007.** Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 364–377.
- Coccia E., Varricchio E. and Paolucci M. 2011.** Digestive Enzymes in the Crayfish *Cherax albidus*: Polymorphism and partial characterization. *International Journal of Zoology*, 2011: 1–9 (310371).
- Cooper R.U., Clough L.M., Farwell M.A. and Wes T.L. 2002.** Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279: 1–20.
- Denev S., Staykov Y., Moutafchieva R. and Beev G. 2009.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish, *Aquaculture review*. *International Aquatic Research*, 1: 1–29.
- FAO. 2015.** *Aquaculture Newsletter*. Nutrition-sensitive aquaculture: A timely initiative. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 34P.
- Ferguson R.M.W., Merrifield D.L., Harper G.M., Rawling M.D., Mustafa S., Picchietti S., Blacazar J.L., and Davies S.J. 2010.** The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*).

- Journal of Applied Microbiology, 109(3): 851–862.
- Fernandez Gimenez A.V., Garcia-Carren F.L., Navarrete Del Toro M.A. and Fenucci J.L. 2001.** Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): Partial characterization and relationship with molting. Comparative Biochemistry and Physiology (B), 130: 331–338.
- Fridovich I. 1974.** Superoxide dismutases. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 41: 35–97.
- Gatesoupe F.J. 1999.** The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180: 147–165.
- Gillespie J.P., Kanost M.R. and Trenczek T. 1997.** Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology, 42: 611–643.
- Hernandez-Lopez J., Gollas-Galvan T. and Vargas-Albores F. 1996.** Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology (C), 113: 61–66.
- Hoffman R.L. 1980.** Classification of the Diplopoda. Geneva: Museum d'Histoire Naturelle, Geneve. 237P.
- Jiang G., Yu R. and Zhou M. 2004.** Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. Aquaculture, 241: 61–75.
- Jiravanichpaisal P., Lee B.L. and Soderhall K. 2006.** Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunology, 211: 213–236.
- Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K. and Soderhall K. 2000.** Crustacean hemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191: 45–52.
- Koksal G. 1988.** *Astacus leptodactylus* in Europe. P: 365–400. In: Holdich D.M. and Lowery R.S. (Eds.). Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation. Croom Helm, London.
- Kullisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairanea C. and Kilkc A. 2002.** Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. International Journal of Food Microbiology, 72(3): 215–224.
- Lopez-Lopez S., Nolasco H. and Vega-Villasante F. 2003.** Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Comparative Biochemistry and Physiology (B), 135: 337–347.
- Lowery R.S. 1988.** Growth, moulting and reproduction. P: 83–113. In:

- Holdich D.M. and Lowery R.S. (Eds.). Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation. Croom Helm, London.
- Merrifield D.L., Guroy D., Guroy B., Emery M.J., Liewellyn C.A., Skill S. and Davies S.J. 2010a.** Assessment of *Chlorogloopsis* as a novel microbial dietary supplement for red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 299(1-4): 128–133.
- Merrifield D.L., Harper G., Dimitroglou A., Ringo E. and Davies S.J. 2010b.** Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Journal of Aquaculture Research, 41(8): 1268–1272.
- Moriarty D.J.W. 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, 164: 351–358.
- Pan C.H., Chien Y.H. and Brian H. 2003.** The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 297(1): 107–118.
- Pandiyan P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E.G., Subaramaniyan K., Manikkam S. and Sadayappan B. 2013.** Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today, 5(1): 55–59.
- Pousti I. and Adib Moradi M. 2004.** Comparative Histology and Histotechnique. University of Tehran Publishing, Iran. 610P.
- Samnejhad A., Afsharnasab M. and Kakoolaki S. 2016.** Effect of water temperature on hemocytes and histopathological findings in freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 2(1): 45–53.
- Sang H.M. 2010.** Role of immunostimulants in the culture of decapod crustacean. Ph.D. Thesis, Curtin University, Australia, 183P.
- Shelby R.A., Lim C., Yildirim-Aksoy M. and Klesius P.H. 2007.** Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and diseases resistance in young channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Applied Aquaculture, 19: 81–91.
- Soderhall K. and Cerenius L. 1998.** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10: 23–28.
- Sritunyalucksana K. and Soderhall K. 2000.** The proPo and clotting system in crustaceans. Aquaculture, 191: 53–69.
- Sumon M.S., Ahmmed F., Khushi S.S., Ahmmed M.K., Rouf M.A., Chisty Md.A.H. and Sarower**

- Md.G. 2018.** Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. Journal of King Saud University–Science, 30: 21–28.
- Sun Y., Oberley L.W. and Li Y. 1988.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chemistry, 34: 497–500.
- Tcherkashina N.Y. 1977.** Survival, growth and feeding dynamics of juvenile crayfish (*Astacus leptodactylus cubanicus*) in ponds and the river Don. Freshwater Crayfish, 3: 95–100.
- Valipour A., Shariatmadari F., Abedian A., Seyfabadi S.J. and Zahmatkesh A. 2011.** Growth, molting and survival response of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus*, fed two sources of dietary oils. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(3): 505–518.
- Van De Braak C.B.T., Botterblom M.H.A., Liu W., Tavern N., Van Der Knaap W.P. and Rombout J.H.W.M. 2002.** The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish and Shellfish Immunology, 12(3): 253–272.
- Vazquez J.A., Gonzalez M.P. and Murado M.A. 2005.** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245: 149–161.
- Wang Y.B. 2007.** Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269: 259–264.
- Yanbo W. and Zirong X. 2006.** Effect of probiotic for common carp (*Cyprinu carpio*) based on growth performance and digestive enzymes activities. Animal Feed Science and Technology, 127(3-4): 283–292.
- Zaikov A. 2004.** Investigation on the shelter competition between narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) and the river crab (*Potamon ibericum* Bieb.). Travaux Scientifiques Universite de Plovdiv-Animalia, 40(6): 26–35.
- Zhou X., Tian Z., Wang Y. and Li W. 2010.** Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry, 36(3): 501–509.
- Ziaei-Nejad S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.R. and Shakouri M. 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252: 516–524.

Zokaeifar H., Balcazar 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 and Shellfish Immunology*, 33: 683–689.



Effects of probiotic *Pediococcus acidilactici* on immunological parameters of hemolymph and digestive enzymes of *Astacus leptodactylus* juvenile

MirArman Vaezi^{1*}, Abolghasem Esmaili Fereidouni², Ramin Manaffar³,
Kourosh Amini⁴

Received: October 2017

Accepted: December 2017

Abstract

In this study, the effect of four levels of probiotic *Pediococcus acidilactici* on the diet of *Astacus leptodactylus* juveniles, on immunological parameters of hemolymph and enzyme systems, was investigated. Juvenile crayfish, weighing 10 to 20g, was fed in 4 groups of probiotic concentrations and one control group with three replicates for 84 days. At the end of the experimental period, the sampling of hemolymph in order to measure the hemolymph, immune and enzyme indices and crayfish intestines for digestive enzymes was performed. The results of all treatments and control showed that the highest to lowest homocysts belonged to semi-granitic, large granular and hyaline, respectively. The total number of hemocytes, semi-granular hemocytes, large granular hemocytes and hyaline in probiotic-treated treatments increased significantly compared to the control ($P<0.05$). In addition, the activity of superoxide dismutase and phenol oxidase in the hemolymph of crayfish showed a significant increase ($P<0.05$). Measuring the activity of digestive enzymes including lipase, amylase and protease showed a significant positive effect on all three enzymes ($P<0.05$). Considering the positive and significant effects of probiotic *P. acidilactici* on immunological and digestive indices of young crayfish, it can be used to further increase in the productivity.

Key words: *Astacus leptodactylus*, *Pediococcus acidilactici*, Probiotic, Immune Indices, Digestive Enzyme.

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Animal and Fisheries Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Animal and Fisheries Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

3- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

4- Assistant Professor in Inland Waters Aquatic Stocks Research Center, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: armanvaezi1396@gmail.com