

## بررسی عملکرد رشد و آنزیم‌های گوارشی در میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه‌شده با عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis* ISO)

پریا اکبری<sup>۱\*</sup>، جمیله میروزی<sup>۱</sup>، زهرا میروزی<sup>۱</sup>، امیر آرامون<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.  
<sup>۲</sup>سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور  
چابهار، چابهار، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۱

### چکیده

مطالعه اثرات عصاره ماکرو جلبک و پروبیوتیک‌های گونه باسیلوس در میگوی پاسفید غربی برای بهبود شیوه‌های آبزی پروری، بهبود سلامت و رشد میگو، مدیریت مؤثر بیماری‌ها و ارتقای پایداری در صنعت حیاتی است. بنابراین در این تحقیق به بررسی اثر توأم عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*Stoechospermum marginatum* و *Sargassum ilicifolium*، *Padina australis*) و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis* ISO) بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی پرداخته شده است. در این مطالعه، ۲۴۰۰ پست لاروها با میانگین وزنی  $28/9 \pm 1/02$  میلی‌گرم به‌طور تصادفی با تراکم ۱۰۰ قطعه در هر واحد آزمایش توزیع شدند. هشت تیمار شامل: گروه شاهد از جیره غذایی فاقد عصاره ترکیبی ماکرو جلبک (MPE) و پروبیوتیک تک‌سل (P) و بقیه گروه‌ها به‌ترتیب از جیره غذایی حاوی ۱۵ گرم بر کیلوگرم غذا عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها (MPE)، ۱ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۱</sub>)، ۲ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۲</sub>)، ۳ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۳</sub>)، عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۱ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۱</sub>)، عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۲ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۲</sub>) و تیمار حاوی عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۳ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۳</sub>) به‌مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. از کیت‌ها و دستگاه اسپکتروفتومتر برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ضریب رشد ویژه، وزن نهایی، وزن به‌دست آمده در گروه‌های تغذیه‌شده با MPE+P<sub>۲</sub> و MPE+P<sub>۳</sub> مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و بقیه گروه‌های مورد آزمایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تغذیه‌شده با MPE+P<sub>۲</sub> و MPE+P<sub>۳</sub> مشاهده شد. میزان بقاء در بین گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را بایکدیگر نشان نداد ( $P > 0/05$ ). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز ( $8/33 \pm 0/11$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین، آمیلاز ( $543/33 \pm 15/27$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین و پروتئاز ( $488/66 \pm 10/21$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین در گروه تغذیه‌شده با MPE+P<sub>۲</sub> مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده توأم عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*S. marginatum* و *S. ilicifolium*، *P. australis*) با غلظت‌های ۲ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا، باعث بهبود عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوی پاسفید می‌شود.

**کلید واژگان:** عصاره پرمیکس ماکرو جلبک‌ها، پروبیوتیک تک‌سل، میگوی وانامی، عملکرد رشد، آنزیم‌های گوارشی

## مقدمه

نه تنها می‌تواند منجر به کاهش هزینه‌های غذا و غذادهی به سبب مقدار کمتر غذادهی گردد بلکه می‌تواند از ایجاد آلودگی‌های ثانویه آب محیط پرورشی و به‌دنبال آن کاهش کیفیت آب جلوگیری نماید. بنابراین تمامی این عملکردها به‌صورت کارایی بالای تغذیه، رشد بهتر و کاهش هزینه‌های تولید می‌تواند در آبی‌پروری پایدار یک امتیاز بارز قلمداد گردد و پرورش‌دهندگان میگو می‌توانند این مکمل را در رژیم غذایی خود بگنجانند تا به عملکرد و سودآوری بهتر دست یابند (Lara-Flores, 2011). علاوه بر این، بعضی از باکتری‌ها ممکن است در مراحل هضم دوکفه‌ای‌ها، میگو و ماهی با تولیدات آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئازها، لیپازها و تولید فاکتورهای ضروری رشد شرکت نمایند (Bakcazar et al., 2006). مطالعات متعددی در زمینه اثر انواع پروبیوتیک بر بهبود رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی از جمله پروبیوتیک (AquaStar® Biomin GmbH) (Gruber et al., 2023)، گونه‌های باکتری باسیلوس، به نام *B. subtilis* و *B. licheniformis* (Monier et al., 2023)، پروبیوتیک *Bacillus subtilis* (Zokaeifar et al., 2012; Keysami et al., 2012) صورت گرفته است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که جلبک‌های دریایی پتانسیل افزوده‌شدن به خوراک آبیان به‌عنوان مکمل غذایی به‌دلیل در دسترس بودن، هزینه پایین و ارزش غذایی بالا را دارا می‌باشند (کاشمی و همکاران، ۱۳۹۵). جلبک‌های دریایی دارای مقادیر زیادی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و انواع کارتنوئیدها می‌باشند که تقریباً اکثر جلبک‌های دریایی را به‌عنوان مواد کاربردی با ارزش بالا مورد استفاده قرار می‌دهند (Periera, 2012). از مهم‌ترین منابع زیستی و طبیعی کشور که دارای ارزش اقتصادی و کاربردهای شیلاتی بسیاری می‌باشد وجود جلبک‌های دریایی است که از استعدادهای بالقوه سواحل جنوبی کشور محسوب می‌شوند (Rabei et al., 2007). افزایش رشد و بهبود طبیعی فلور روده و معده از فواید استفاده از عصاره‌های جلبکی به‌عنوان افزودنی‌های غذایی به جیره می‌باشد (Chojnacka et al., 2012). بنابراین استفاده از جلبک‌های دریایی در آبی‌پروری به‌علت داشتن مواد مغذی نظیر آنتی‌اکسیدان‌ها، اسیدهای چرب ضروری (امگا ۳ و ۶)، اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها، مواد معدنی، کربوهیدرات‌ها و بتاکاروتن رو به گسترش است

به‌موازات افزایش آگاهی از ارزش غذایی آبیان، انتظار می‌رود که در آینده تقاضا برای مصرف ماهی و میگو افزایش یابد. بنابراین با توجه به شرایط کنونی که مزارع پرورش آبیان در حال افزایش می‌باشند، لزوم افزایش دانش و آگاهی فناوری زیستی در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد (Castillo et al., 2014). در سطح جهانی این صنعت از نظر تنوع گونه‌ای، افزایش تراکم و پرورش در حال گسترش است و در حال حاضر هدف از آبی‌پروری به حداکثر رساندن بازدهی تولید برای بهینه‌سازی سودآوری می‌باشد (Tacon et al., 2002; Xue et al., 2016; Adel et al., 2017). استفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از دست‌آوردهای مفید مثبت در این زمینه عنوان کرد و اخیراً در آبی‌پروری متداول گردیده است (Merrifield et al., 2021; Butt et al., 2010). برخی محققین پیشنهاد کرده‌اند که پروبیوتیک‌ها اثر مفیدی روی مراحل هضم در حیوانات آبی دارند (Regpipat et al., 1998; Decamp, 2008; Liu et al., 2010; Zokaeifar et al., 2012; Lim et al., 2019). از مزایای پروبیوتیک‌ها می‌توان به رقابت با باکتری بیماری‌زا بر سرفضا، غذا و اکسیژن، تحریک اشتها در نتیجه مصرف میزان غذای مطلوب به‌وسیله آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز، ترکیبات غیرقابل‌هضم جیره را تجزیه کرده و با تولید ویتامین‌هایی مانند ریوفلاوین و K افزایش رشد و بقاء و افزایش ایمنی در میزبان اشاره کرد که در نتیجه بهبود عملکردهای ایمنی، مقاومت نسبت به بیماری، کاهش استرس، بازماندگی، افزایش شاخص رشد و بازدهی تغذیه و افزایش کیفیت گوشت مشاهده می‌شود (بیتا و همکاران، ۱۳۹۶). از طرفی، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک دفاع مؤثر در برابر میکروب‌های مضر عمل می‌کنند (Mirbakhsh et al., 2022; Gruber et al., 2023). بنابراین به بهبود رشد میگو، نسبت تبدیل خوراک و بقای عمومی حیوانات می‌تواند کمک کنند و به‌عنوان خوراک عملکردی منجر به بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی، کنترل فراوانی باکتری‌های بیماری‌زا، تعادل سیستم ایمنی و افزایش پارامترهای رشد در آبی‌پروری گردند. از طرفی یکی از عوامل اقتصادی بودن پرورش آبیان مقدار ضریب تبدیل غذایی است که در آبیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک کمترین ضریب تبدیل غذایی مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری ماکرو جلبک‌ها:** جمع‌آوری دستی جلبک‌های پادینا (*Padinaastraulis*)، جلبک سارگاسوم (*Sargassumilicifolium*) و *Stoechospermummarginatum* در فاصله ماه‌های آذر و اسفندماه ۱۴۰۲ از سواحل چابهار (دریا بزرگ و تیس) هنگام جزر صورت گرفت و پس از حمل به آزمایشگاه، با آب شیرین چندین بار شستشو شدند تا گل و لای و موجودات اپی فیت آنها کاملاً از بین رفت. سپس به مدت ۱۰ روز به خشک کردن آن‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به دور از نور مستقیم خورشید پرداخته شد (Akbari et al., 2023). در ضمن قبل از خشک شدن، شناسایی هر سه گونه جلبک نیز توسط رفرنس‌های معتبر صورت گرفت (قرنچیک و روحانی‌قادی‌کلابی، ۱۳۸۹).

**تهیه و آماده‌سازی عصاره پرمیکس ماکرو جلبک‌ها:** به منظور عصاره‌گیری، ابتدا ماکرو جلبک‌های خشک شده *P. astraulis* و *S. marginatum* توسط آسیاب برقی پودر شدند. سپس مقدار ۲۰۰ گرم پودر مخلوط حاصل از سه گونه ماکرو جلبک (۱:۱:۱) تهیه شد. برای تهیه عصاره از روش Chouhury و همکاران، (۲۰۰۵) استفاده شد. برای به دست آوردن عصاره آبی پرمیکس ماکرو جلبک‌ها، مقدار ۵ گرم پودر حاصله از پرمیکس (با نسبت ۱:۱:۱) با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه به خوبی تکان داده شد. سپس درب ظروف را بسته و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. سپس محلول رویی با دقت جمع‌آوری و پس از عبور از کاغذ صافی (کاغذ واتمن شماره ۱، اندازه مش ۱۱ میکرومتر)، با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان (IKA, Germany) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت عصاره تغلیظ گردید و تا زمان استفاده در دسیکاتور نگهداری شد.

**تهیه جیره‌های غذایی حاوی عصاره پرمیکس و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis*):** به منظور تهیه جیره حاوی ۱۵ گرم عصاره پرمیکس به هر کیلوگرم غذای کنسانتره (ساخت کارخانه فرادانه با ۲۸ درصد پروتئین، ۹ درصد چربی، ۲۵ درصد فیبر و ۹ درصد رطوبت) ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره (۶۰ روز) برای هر تیمار محاسبه سپس با درصد مشخص آب مقطر و روغن (۱:۱) عصاره را به جیره اسپری و در مجاورت دمای اتاق خشک شد. همچنین برای

(Rajapakse and Kim, 2011; Arumugama et al., 2017). استفاده از آنها در رژیم غذایی آبزیان نه تنها هزینه تغذیه را کاهش می‌دهد بلکه منجر به بهبود کارایی تغذیه آبزیان و هضم ماهیان می‌گردد (Tabarsa et al., 2012) و با بهبود کارایی هضم، کیفیت آب را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Banerjee et al., 2010). مطالعات متعدد در زمینه اثر گونه‌های مختلف جلبک بر روی گونه‌های مختلف میگو از جمله ماکرو جلبک *Chaetomorpha clavata* (Borges et al., 2024)، ماکرو جلبک‌های بومی در سواحل گرمسیری چین (Zhang et al., 2023)، عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*Sargassumilicifolium*)، *Padina australis*، *Nizimuddiniana zanardini* و جلبک *Cystoseira indica* (Akbari et al., 2023)، گراسیلاریا (*Gracilaria pygmaea*) (اوجی‌فر و همکاران، ۱۳۹۶)، پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جلبک دریایی (*Enteromorpha*) (Liu et al., 2020) صورت گرفته است که باعث بهبود پارامترهای رشد، بقا و قابلیت هضم روده میگو شده است.

امروزه برای رسیدن به تولید بالا و پایدار نیاز است تا پست لاروهایی با کیفیت بالا، ذخیره‌سازی شوند بنابراین استفاده از ماکرو جلبک‌های بومی منطقه (با دارا بودن مواد فعال زیستی و دارویی) به همراه پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis*) به عنوان مکمل غذایی می‌تواند نیازهای غذایی پست لاروها را فراهم سازد که این موضوع در کیفیت پست لاروها و در نهایت تولید پایدار میگو بسیار مهم است. از طرفی، انجام مطالعات تطبیقی با سایر سویه‌ها یا ترکیبات پروبیوتیک به همراه این عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها می‌تواند به تشخیص بهترین فرمولاسیون‌ها برای بهبود رشد و سلامت میگو کمک کند. از این رو هدف از این تحقیق، بررسی اثر توأم عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*Padina astraulis*) و *Sargassum ilicifolium* و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis*) بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوی پاشفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) است.

شیمیایی آب از جمله حرارت با دما سنج جیوه‌ای با دقت ۰/۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتالی اندازه‌گیری اکسیژن (TECPEL DO-1609) و اندازه‌گیری PH به روش الکترونیکی (Ebro, PHT-3140) به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد میانگین دمای آب  $20 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن  $5.0 \pm 0.8$  میلی‌گرم بر لیتر، اسیدیته  $5/7$  و شوری  $47.0 \pm 3.5$  گرم بر لیتر ثابت نگه داشته شد.

**زیست‌سنجی میگو:** در پایان دوره آزمایش (۶۰ روز) طول و وزن تمام میگوها به ترتیب با دقت‌های ۱ میلی‌متر و ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی، وزن نهایی ( $W_f$ )، میزان درصد وزن به‌دست آمده ( $WG$ )، بقا، ضریب تبدیل غذایی ( $FCR$ )، ضریب رشد ویژه ( $SGR$ ) و میزان کارایی پروتئین ( $PER$ ) در زیر نشان داده شده است (Harikrishnan *et al.*, 2011; Akbary *et al.*, 2020).

$$SGR(\% \cdot \text{day}^{-1}) = \frac{(\ln W_f - \ln W_i)}{t} \times 100$$

$W_i$ : وزن اولیه (گرم)،  $W_f$ : وزن نهایی (گرم)،  $t$ : طول دوره پرورش (روز)

$$WG(\%) = \frac{(W_f - W_i)}{W_i} \times 100$$

که در این رابطه‌ها  $W_f$ : وزن نهایی (گرم)،  $W_i$ : وزن اولیه (گرم) است.

$$FCR = WG/F$$

$F$ : مقدار غذای مصرف شده (گرم)،  $WG$ : وزن به‌دست آمده  $\times 100$  (تعداد لاروهای ذخیره شده در ابتدای دوره/تعداد لاروهای باقی‌مانده در پایان دوره = درصد بازماندگی)

**نمونه‌برداری روده میگوی پاشفید غربی:** برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، ۴۸ ساعت پیش از نمونه‌برداری، تغذیه میگوها متوقف شد. سپس ۶ عدد میگو از هر تکرار برای هر گروه مورد آزمایش، به‌صورت تصادفی انتخاب و در مجاورت یخ جهت جلوگیری از تغییر فعالیت آنزیمی کالبدشکافی و روده آنها با دقت جدا و محتویات داخل آن تخلیه و سپس با آب مقطر به‌خوبی شسته شد. نمونه‌های روده بلافاصله در شرایط انجماد در دمای  $-20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Chitsaz *et al.*, 2018) و نیمی از نمونه‌های روده از هر گروه نیز به‌منظور بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد.

**سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاشفید غربی:** برای سنجش میزان آنزیم‌های گوارشی،

تهیه جیره‌های آزمایشی حاوی باکتری باسیلوس سابتیلیس با دوز  $10^{12} \times 2/5$  CFU/g (نام تجاری تک‌سل-شرکت تک‌ژن زیست، ایران) و جیره‌های آزمایشی حاوی عصاره و پروبیوتیک تک سل از روش Wache و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. به این ترتیب که ۱، ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک تک‌سل به‌ازای هر ۱۰۰ گرم غذا به‌همراه عصاره جلبک با روغن ماهی (۳۲ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم غذا) مخلوط و سپس سوسپانسیون پروبیوتیک-جلبک و روغن بر روی غذا اسپری و در مجاورت دمای اتاق خشک شدند و سپس برای مصرف در کل دوره آزمایش در دمای  $-20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Akbary *et al.*, 2023).

**تأمین پست لارو میگو پاشفید غربی و تیمار بندی:** ۲۴۰۰ پست لارو ۱۵ روزه میگو پاشفید غربی مورد نیاز جهت انجام این تحقیق با میانگین وزن  $1/0.2 \pm 28/9$  میلی‌گرم، از طریق مرکز تکثیر میگوی خصوصی واقع در کنارک تأمین شد و توسط پلاستیک حمل دو لایه درحالی‌که یک سوم آن از آب و مابقی از هوا پر شد به سالن تکثیر و پرورش ماهیان مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار انتقال یافت. پس از یک هفته از دوره سازگاری، پست لاروها به‌صورت تصادفی در ۸ گروه و هر گروه با سه تکرار و ۱۰۰ عدد پست لارو در هر تکرار با نام‌های گروه کنترل از جیره غذایی فاقد عصاره ترکیبی ماکرو جلبک و پروبیوتیک تک‌سل تغذیه شد و بقیه گروه‌ها به‌ترتیب گروه‌شاهد از جیره غذایی فاقد عصاره ترکیبی ماکرو جلبک (MPE) و پروبیوتیک تک‌سل (P) و بقیه گروه‌ها به‌ترتیب از جیره غذایی حاوی ۱۵ گرم بر کیلوگرم غذا عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها (MPE)، ۱ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۱</sub>)، ۲ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۲</sub>)، ۳ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (P<sub>۳</sub>)، عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۱ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۱</sub>)، عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۲ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۲</sub>) و تیمار حاوی عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها با غلظت ۳ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا پروبیوتیک تک‌سل (MPE+P<sub>۳</sub>) هر ۴ ساعت یک بار (۶ نوبت در روز) تا حد سیری به‌مدت ۸ هفته غذاددهی شدند (قائدنیا و همکاران، ۱۳۹۹). هر دو روز یک‌بار، یک‌سوم آب هر تانک مورد تعویض قرار گرفت و مواد دفعی در هر تانک به‌وسیله سیفون خارج شد. در طول دوره آزمایش شرایط فیزیکی و

جدول ۱- عملکرد رشد و بقاء میگوی پا سفید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

تیمار	وزن اولیه (میلی‌گرم)	وزن نهایی (میلی‌گرم)	وزن به‌دست‌آمده	ضریب رشد ویژه (درصد)	بقاء (درصد)	ضریب تبدیل غذایی
شاهد	29/00 ± 1/00	1075/61 ± 274/95 <sup>c</sup>	36/09 ± 9/28 <sup>c</sup>	6/02 ± 0/33 <sup>c</sup>	97/86 ± 0/51 <sup>a</sup>	2/73 ± 0/12 <sup>a</sup>
MPE	29/13 ± 0/91	1513/33 ± 229/49 <sup>b</sup>	50/95 ± 7/73 <sup>b</sup>	6/56 ± 0/26 <sup>b</sup>	98/13 ± 1/12 <sup>a</sup>	1/63 ± 0/13 <sup>b</sup>
P <sub>1</sub>	28/86 ± 1/06	1420/00 ± 133/09 <sup>b</sup>	48/25 ± 11/66 <sup>b</sup>	6/45 ± 0/39 <sup>b</sup>	98/53 ± 0/91 <sup>a</sup>	1/67 ± 0/12 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub>	28/93 ± 0/96	1533/23 ± 195/18 <sup>b</sup>	52/05 ± 7/01 <sup>b</sup>	6/60 ± 0/31 <sup>b</sup>	98/66 ± 1/17 <sup>a</sup>	1/68 ± 0/11 <sup>b</sup>
P <sub>3</sub>	28/80 ± 1/80	1500/00 ± 330/00 <sup>b</sup>	51/06 ± 10/23 <sup>b</sup>	6/53 ± 0/35 <sup>b</sup>	98/13 ± 0/99 <sup>a</sup>	1/58 ± 0/12 <sup>b</sup>
P <sub>1</sub> +MPE	29/00 ± 0/92	1513/30 ± 250/33 <sup>b</sup>	51/17 ± 8/43 <sup>b</sup>	6/56 ± 0/28 <sup>b</sup>	98/00 ± 1/00 <sup>a</sup>	1/64 ± 0/11 <sup>b</sup>
P <sub>2</sub> +MPE	28/80 ± 1/08	2060/00 ± 274/64 <sup>a</sup>	70/71 ± 10/33 <sup>a</sup>	7/10 ± 0/25 <sup>a</sup>	98/06 ± 1/03 <sup>a</sup>	1/32 ± 0/31 <sup>c</sup>
P <sub>3</sub> +MPE	28/66 ± 1/29	1973/34 ± 179/15 <sup>a</sup>	67/80 ± 4/88 <sup>a</sup>	7/04 ± 0/12 <sup>a</sup>	97/93 ± 0/89 <sup>a</sup>	1/34 ± 0/11 <sup>c</sup>

مقادیر (میانگین ± خطای معیار، حاصل سه تکرار) با حروف ناهمسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است. ( $P < 0/05$ ).

درصد انجام گرفت. از نرم‌افزار SPSS و پیرایش ۱۹ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و از نرم‌افزار Excel و پیرایش ۲۰۱۰، جهت محاسبات آماری استفاده گردید.

### نتایج

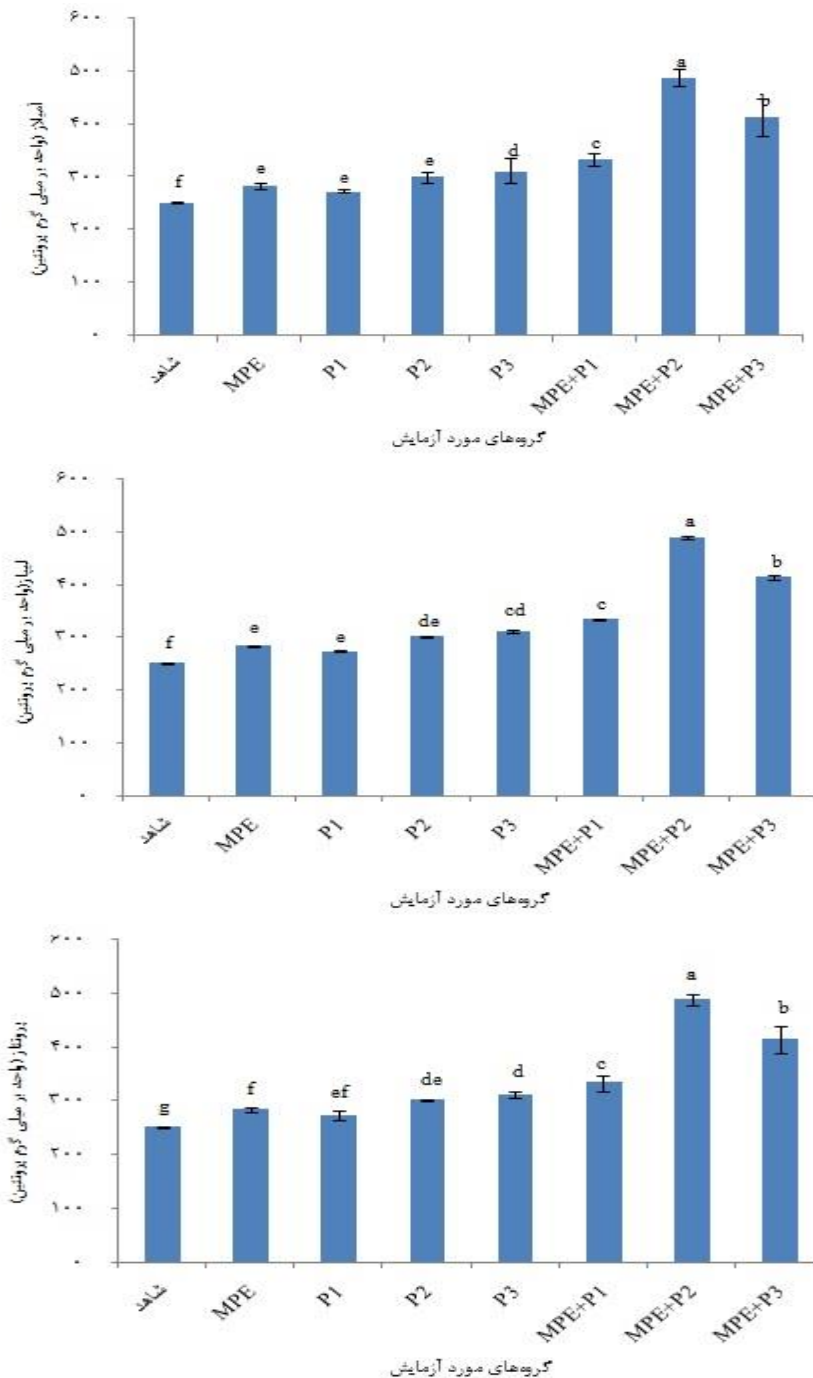
**عملکرد رشد:** عملکرد رشد و بقاء میگوی پاسفید غربی (L. vannamei) تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان بقاء در بین گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). بیشترین میزان ضریب رشد ویژه، وزن نهایی، وزن به‌دست آمده در گروه‌های تغذیه شده با  $MPE+P_2$  و  $MPE+P_3$  مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و بقیه گروه‌های مورد آزمایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). درحالی‌که عملکرد رشد بین گروه‌های تغذیه شده با  $MPE$ ،  $P_1$ ،  $P_2$ ،  $P_3$  و  $MPE+P_1$  اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/05$ ). کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تغذیه شده با  $MPE+P_2$  و  $MPE+P_3$  مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان ضریب تغذیه در گروه شاهد ( $2/73 \pm 0/12$ ) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با بقیه گروه‌های مورد آزمایش نشان داد ( $P < 0/05$ ).

**فعالیت آنزیم‌های گوارشی:** نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز روده میگوی پاسفید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در نمودار شکل ۱ ارائه شده است. اضافه نمودن توأم عصاره ترکیبی ماکروجلبک با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با گروه شاهد شد ( $P < 0/05$ ). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز

نمونه‌های روده از شرایط انجام خارج گردیدند. سپس روده هر ماهی با ۱۰۰ میلی‌مولار بافر تریس-اسید کلریدریک، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۰/۱ درصد تربیتون  $X-100$  به نسبت ۹:۱ در pH ۷/۸ به نسبت وزنی به حجمی ۱۰ برابر (۱/۱۰) توسط یک دستگاه یکنواخت‌کننده (هموژنایزر) (مدل UP200S، شرکت Hielscher آلمان) به خوبی در مجاورت یخ صورت گرفت یکنواخت شدند (Chitsaz et al., 2018). جهت جداسازی عصاره حاوی آنزیم مخلوط‌های یکنواخت‌شده، سانتریفیوژ روده با سرعت ۲۵۰۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Gawlika et al., 2000). در انتها محلول رویی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (با سه تکرار برای هر گروه) به منظور سنجش آنزیمی جمع‌آوری شد. از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR600، ساخت HACH آمریکا) برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی استفاده شد.

میزان فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش Natalia و همکاران (۲۰۰۴) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، میزان فعالیت آنزیم پروتئاز به روش King (۱۹۷۲) در طول موج ۲۸۰ نانومتر و میزان فعالیت آنزیم لیپاز به روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) در طول موج ۴۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. فعالیت آنزیم‌ها براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین با سه تکرار برای هر گروه محاسبه شدند.

**روش تجزیه و تحلیل آماری:** ابتدا از تست کولموگروف-اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها و از تست لون برای برابری واریانس‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها (سه تکرار برای هر تیمار) از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵



شکل ۱- نمودار میانگین و خطای معیار میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش. حروف ناهمسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

معنی داری را با گروه‌های تغذیه شده با MPE، P<sub>1</sub> و گروه‌های تغذیه شده با استفاده توأم عصاره ترکیبی ماکرو جلبک با غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک سل نشان داد ( $P < 0.05$ ). میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز، بین گروه‌های تغذیه شده با MPE و P<sub>1</sub> اختلاف معنی داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

( $11/33 \pm 0.11$  واحد بر میلی گرم پروتئین)، آمیلاز ( $27/15 \pm 543/33$  واحد بر میلی گرم پروتئین) و پروتئاز ( $21/488 \pm 10/66$  واحد بر میلی گرم پروتئین) در گروه تغذیه شده با MPE+P<sub>2</sub> مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز در گروه تغذیه شده با P<sub>3</sub> به ترتیب برابر  $14/5 \pm 64/5$ ،  $35/23 \pm 66/254$  و  $50/23 \pm 11/31$  واحد بر میلی گرم پروتئین بود که اختلاف

## بحث و نتیجه‌گیری

یکی از جنبه‌های مهم آبی‌پروری بکارگیری منابع غذایی کم ارزش در جهت افزایش کارایی تغذیه و همچنین کاهش هزینه‌ها می‌باشد (Xue et al., 2016; Adel et al., 2002; Tacon et al., 2017). مطالعه پروبیوتیک‌ها و عصاره ماکرو جلبک‌ها بر روی میگوی پاسبید غربی برای افزایش عملکرد رشد، بهبود سلامت و ایمنی و ترویج شیوه‌های پایدار آبی‌پروری است. این عوامل به‌طور جمعی به دوام اقتصادی و پایداری زیست‌محیطی پرورش میگو کمک می‌کنند (Omar et al., 2024)

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده تنها از عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*S. P. australis*، *S. marginatum* و *ilicifolium*) (گروه MPE) در جیره غذایی میگوی پاسبید غربی منجر به افزایش وزن و ضریب رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به گروه شاهد شد. Akbary و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی سطوح مختلف عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*Nizimuddin Sargassumilicifolium*، *Padina australis zanardini* و *Cystoseira indica*) بر رشد، ارزش غذایی و بیوشیمیایی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی میگوی پاسبید غربی نشان دادند که بیشترین رشد، و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی در سطح ۱۵ گرم بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. Putra و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که افزایش وزن میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) تغذیه‌شده با ماکرو جلبک سبز (*Caulerpa lentillifera*) به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین، تغذیه میگوی پاسبید غربی (*L. vannamei*) با ماکرو جلبک قهوه‌ای (*Sargassumilicifolium*) نیز باعث افزایش معنی‌دار زیست‌توده نهایی و FCR در مقایسه با گروه شاهد شد (Hafezieh et al., 2017). در این آزمایش، مشخص شد که رژیم غذایی ماکرو جلبک‌ها می‌توانند عملکرد رشد از جمله افزایش وزن و ضریب رشد ویژه میگو را نسبت به گروه شاهد ارتقاء دهند، که ممکن است به این دلیل باشد که ماکرو جلبک‌ها غنی از اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری هستند و مواد معدنی و ویتامین‌های C و E می‌توانند به‌عنوان مکمل‌های غذایی برای میگوها استفاده شوند (Akbary et al., 2023). با این حال، نیاز است که اجزای

مؤثر خاص ماکرو جلبک‌ها در ترویج رشد میگوها بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی، استفاده تنها از سطوح ۱، ۲ و ۳ گرم بر ۱۰۰ گرم پروبیوتیک تک‌سل ( $P_1, P_2, P_3$ ) در جیره غذایی میگوهای مورد آزمایش نیز منجر به افزایش معنی‌دار عملکرد رشد و کارایی غذا در مقایسه با گروه شاهد شد ولی اختلاف معنی‌داری را با گروه MPE نشان ندادند. Gruber و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که مواد افزودنی پروبیوتیک می‌توانند به بهبود سلامت روده میگوها کمک کنند و در نتیجه عملکرد، کارایی تولید و مقاومت در برابر بیماری‌ها را افزایش دهند. آنها با بررسی سطح ۳ گرم در کیلوگرم غذا پروبیوتیک (AquaStar® Biomin GmbH) در ترکیب‌های خوراک با سطوح مختلف آرد دریایی ۱۵ و ۳۲ درصد بر رشد و مقاومت میگوی پاسبید غربی در برابر *Vibrio parahaemolyticus* نشان دادند که مستقل از نوع رژیم غذایی، استفاده از مکمل پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری نرخ بقا و نرخ رشد میگوها را افزایش داد و در عین حال مصرف خوراک و نسبت تبدیل خوراک را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. Adilah و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی بهبود اثر بخشی پروبیوتیک باسیلوس سابیتیلیس E20- تحریک‌کننده رشد و وضعیت سلامتی میگوی پاسبید غربی، *Litopenaeus vannamei* از طریق کپسوله‌سازی در آلژینات و پوشش داده شده با کیتوزان گزارش کردند که تجویز  $10^7$  CFU/kg از پروبیوتیک پوشش‌دار شده منجر به بهبود رشد در مقایسه با تیمار شاهد (تغذیه‌شده با پروبیوتیک غیرپوشش‌دار) شد. بهترین عملکرد رشد و وضعیت سلامتی در میگوهای تغذیه‌شده با دوز بالاتر از  $10^8$  kg از پروبیوتیک پوشش‌دار شده مشاهده شد که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در زمینه گروه‌های تغذیه‌شده تنها با سطوح مختلف پروبیوتیک تک‌سل در مقایسه با گروه شاهد همخوانی داشت. این موضوع احتمالاً به اثرات تغذیه‌ای افزودنی پروبیوتیک و توانایی آن در بهبود استفاده از پروتئین برای رشد یا سنتز بافت مربوط می‌شود (Gurber et al., 2023). با اینکه میگوها مونومرهای گلوکز را به‌خوبی نمی‌توانند استفاده کنند، اما کارایی آنها در استفاده از نشاسته ۹۲ درصد است. بنابراین، فعالیت آلفا آمیلاز پروبیوتیک‌ها نمی‌تواند به میگوها کمک کند. اما هیدرولیز مولکول‌های گلوتن توسط سویه باکتری *B. subtilis* ممکن است تأثیر مثبتی بر کارایی تغذیه و نرخ رشد میگوها داشته باشد (Yalcin et al.,

رژیم غذایی شدند. همچنین قاندا و همکاران (۱۳۹۹) با بررسی اثر پروبیوتیک تک‌سل بر روی وضعیت سلامتی میگوی پاسفید غربی اختلاف معنی‌داری در میزان بقاء تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک با گروه شاهد مشاهده نکردند که با نتایج ما همخوانی داشت

بین نوع و مقدار مواد مغذی موجود در خوراک و تعداد و عملکرد آنزیم‌های گوارشی در جانوران آبی ارتباط قوی وجود دارد (Monier et al., 2023). Monier و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی تأثیرات استفاده پروبیوتیک تجاری از گونه‌های باکتری باسیلوس، به نام-SANOLIFE®PRO W (شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis*)، بر آنزیم‌های گوارشی، میگوهای پاسفید غربی نشان دادند که استفاده از آب حاوی باکتری باسیلوس، فعالیت آنزیم‌های گوارشی را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد. همچنین گزارش شده است که *B. licheniformis* می‌تواند قابلیت هضم مواد مغذی را در جانوران آبی با افزایش تولید آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، پروتئاز و سلولاز بهبود بخشد. به نظر می‌رسد افزایش آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و لیپاز عامل اصلی بهبود عملکرد رشد باشد. Oment و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر سه نوع عصاره جلبک دریایی (*Ulva lactuca*، *Eisenia sp.* و *Porphyra sp.*) بر بهبود رشد و فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی نشان دادند که در مورد فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین، لیپاز و آمیلاز، یک تعامل معنی‌دار بین نوع جلبک دریایی و سطح گنجاندن مشاهده شد که در بیشتر موارد، گنجاندن ۵ درصد از هر نوع جلبک دریایی باعث افزایش فعالیت‌های آنزیمی شد. نتایج این مطالعه نیز نشان داد استفاده از عصاره ترکیبی ماکروجلبک‌ها نیز منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های لیپاز آمیلاز و پروتئاز شد. می‌توان گفت سنتز و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میگوهای بسته به ترکیب رژیم غذایی تنظیم می‌شود (Omont et al., 2019). در سخت‌پوستان، مجموعه‌ای از پروتئازهای مختلف سیستم پروتئولیتیک را تشکیل می‌دهند و ایزوفورم‌های پروتئولیتیک (مانند فنوتیپ‌های تریپسین) در ویژگی‌های کاتالیزوری یا خاصیت متفاوت هستند که به ارگانسیم‌ها در هضم بهتر کمک می‌کنند (Perera et al., 2010). در مورد آنزیم لیپاز، تمام رژیم‌های غذایی حاوی جلبک (*MPE*، *MPE+P<sub>۱</sub>*، *MPE+P<sub>۲</sub>* و *MPE+P<sub>۳</sub>*) فعالیت بیشتری نسبت به رژیم

Oment (2021) و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر سه نوع عصاره جلبک دریایی (*Ulva lactuca* sp. *Eisenia* و *Porphyra* sp.) بر بهبود رشد و فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی نشان دادند که با افزایش سطح عصاره جلبک دریایی، به طور معنی‌داریوزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد خاص و مصرف خوراک را در مقایسه با رژیم کنترل بهبود دادند. به طور کلی، رژیم‌های حاوی *Ulva* بهترین عملکرد رشد را داشتند. Novriadi و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی مکمل‌های غذایی حاوی پروبیوتیک‌های مخلوط مانند *Lactobacillus reuteri*، *Enterococcus acidilactici* و *Bacillus subtilis* نشان دادند که کارایی خوراک میگو را بهبود بخشیدند. همچنین بیشترین میزان ضریب رشد ویژه، وزن نهایی، وزن به‌دست آمده در گروه‌های تغذیه‌شده با استفاده توأم عصاره ترکیبی ماکروجلبک با دو سطح ۲ و ۳ گرم بر ۱۰۰ گرم مشاهده شد و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تغذیه‌شده با *MPE+P<sub>۲</sub>* و *MPE+P<sub>۳</sub>* مشاهده شد. می‌توان گفت که جلبک دریایی به دلیل ارزش نسبتاً پروتئین بالا، محتوای اسید آمینه ضروری، ویتامین‌ها و فلزات کمیاب به‌عنوان منابع پروتئینی جایگزین برای آبی‌پروری نقش دارند (Zhang et al., 2023)، از طرفی، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک دفاع مؤثر در برابر میکروب‌های مضر عمل می‌کنند (Mirbakhsh et al., 2022; Gruber et al., 2023). بنابراین به بهبود رشد میگو، نسبت تبدیل خوراک و بقای عمومی حیوانات به‌صورت توأم می‌تواند کمک کنند و به‌عنوان خوراک عملکردی منجر به بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی، کنترل فراوانی باکتری‌های بیماری‌زا، تعادل سیستم ایمنی و افزایش پارامترهای رشد در آبی‌پروری گردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان بقاء در بین گروه‌های تغذیه‌شده با رژیم‌های غذایی مختلف و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد که با تحقیق صورت گرفته توسط Mazlum و همکاران (۲۰۲۱) همخوانی داشت. آنها گزارش کردند که میزان بقاء در بین خرچنگ‌های باتلاقی قرمز (*Procambarus clarkii*) تغذیه شده با دو ماکروجلبک *Ulva lactuca*، *Jania rubens* و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی منجر به بهبود رشد خرچنگ باتلاقی قرمز در غلظت ۱۰ درصد ماکروجلبک‌ها

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، آمیلاز و پروتئاز نیز بیانگر تأثیر مثبت افزایشدهنده معنی‌دار پروبیوتیک بر هر سه آنزیم مورد بررسی بود. Zokaeifar و همکاران (۲۰۱۲) در تغذیه میگوهای پاسفید غربی توسط دو سویه باسیلوس سابتیلیس به مدت ۸ هفته نشان داد که استفاده از این باکتری‌ها سبب افزایش وزن نهایی، ضریب رشد ویژه و فعالیت آنزیمی در مقایسه با گروه کنترل گردید. می‌توان گفت پروبیوتیک‌ها ممکن است از طریق تولید ویتامین، کوفاکتورها و یا بهبود فعالیت خود آنزیم فعالیت گوارشی را ارتقاء بخشند (واعظی و همکاران، ۱۳۹۷). علاوه بر این، ذکر این نکته ضروری است که در میگوهای تغذیه‌شده با جیره حاوی  $MPE+P_2$  اشتهاها بهتری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های مورد آزمایش در طول دوره تغذیه در این مطالعه مشاهده شد، زیرا بقایای خوراک هضم‌نشده یافت نشد. هضم بهتر غذا ممکن است با افزایش فعالیت آنزیم گوارشی و متعاقباً افزایش اشتها در میگوهای تیمار شده مرتبط باشد. بنابراین با در نظر گرفتن فعالیت آنزیم گوارشی و تحریک اشتها، همراه با کلونیزاسیون *B. Subtilis* در میگوهای تغذیه‌شده با جیره حاوی  $MPE+P_2$  میگوهای سالم‌تر و ضریب رشد بالاتر در مقایسه با کنترل مشاهده شد در کل، نتایج نشان داد که بیشترین میزان ضریب رشد ویژه، وزن نهایی، وزن به‌دست آمده در گروه‌های تغذیه‌شده با  $MPE+P_2$  و  $MPE+P_3$  مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و بقیه گروه‌های مورد آزمایش نشان داد ( $P < 0.05$ ). کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های تغذیه‌شده با  $MPE+P_2$  و  $MPE+P_3$  مشاهده شد. میزان بقا در بین گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان نداد ( $P > 0.05$ ). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز ( $8/33 \pm 0/11$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین، آمیلاز ( $543/33 \pm 15/27$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین و پروتئاز ( $488/66 \pm 10/21$ ) واحد بر میلی‌گرم پروتئین در گروه تغذیه‌شده با  $MPE+P_2$  مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) که می‌توان استفاده توأم عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*S. ilicifolium*, *P. astraulis*) و *S. marginatum* با غلظت‌های ۲ گرم بر ۱۰۰ گرم غذا، باعث بهبود عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگو یا سفید توصیه نمود.

کنترل داشتند. می‌توان گفت که پلی‌ساکاریدهای جلبکی تأثیرات مثبتی بر متابولیسم چربی در گونه‌های مختلف دارند و همچنین ممکن است محتوای چربی را در میگو تغییر دهند (Jimenez-Escrig and Sanchez-Muniz 2000; Sathivel et al., 2008; Tsuge et al., 2004; Oment et al., 2019). در میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) که با پریفیوتون (۶ درصد گنجایش) شامل ۳۷ جنس جلبک و ۵ جنس ژئوپلانکتون تغذیه شدند، فعالیت آنزیم‌های گوارشی بالاتر، شامل آمیلاز، سلولاز، پروتئاز و تریپسین مشاهده شد (Anand et al., 2013). Peixoto و همکاران (۲۰۱۶) اشاره کردند که نسبت بالای آمیلاز به پروتئاز به معنی توانایی بیشتر در هضم کربوهیدرات‌هاست و به ذخیره پروتئین برای رشد کمک می‌کند. توضیح احتمالی دیگر برای بهبود فاکتورهای رشد میگو توسط *B. subtilis* ممکن است به دلیل القای آنزیم‌های گوارشی از جمله پروتئاز و آمیلاز باشد که در نتیجه فعالیت آنزیم گوارشی طبیعی میزبان را تحریک می‌کند (Liu et al., 2009; Zokaeifar et al., 2012; Monier et al., 2023). در این مطالعه، سطح بالاتری از فعالیت کل آنزیم‌های گوارشی در میگوهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی *B. subtilis* ثبت شد که در آن عملکرد رشد بهتری نسبت به شاهد مشاهده شد. نتایج مشابهی توسط Ziaei Nejad و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های گوارشی بالاتری را در میگوی هندی (*Fenneropenaeus indicus*) تیمار شده با باکتری *Bacillus spp.* نسبت به کنترل مشاهده کردند. Monier و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی تأثیرات استفاده پروبیوتیک تجاری از گونه‌های باکتری باسیلوس، به نام SANOLIFE®PRO-W (شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis*)، بر کیفیت آب، آنزیم‌های گوارشی، عملکرد رشد، آنتی‌اکسیدان‌ها، ایمنی ذاتی، ترکیب بدن و مقاومت میگوهای پاسفید غربی در برابر عفونت *Fusarium solani* نشان دادند که پروبیوتیک‌ها خصوصاً در در غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۳ گرم بر متر مکعب باعث افزایش تعداد فعالیت آنزیم‌های گوارشی نسبت به گروه کنترل شد. واعظی و همکاران (۱۳۹۷) با بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بچه شاه‌میگوی آب شیرین *Astacus leptodactylus* بر برخی شاخص‌های سیستم ایمنی و آنزیمی مورد نشان دادند که

## تشکر و قدردانی

پژوهش براساس تحقیقات تأمین مالی شده توسط بنیاد ملی علوم ایران (INSF) تحت پروژه شماره ۴۰۲۶۶۸۲ انجام شده است.

بدین وسیله از زحمات کلیه پرسنل مرکز تحقیقات علوم شیلاتی آب‌های دور چابهار و کارشناس محترم آزمایشگاه پاسارگارد تهران کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم. این

## منابع

- اوجی فرد ا.، غلامی س.، ستودها، قانڈنيا ب. ۱۳۹۶. عملکرد رشد، تغذیه، پایداری غذا و قابلیت‌هم‌مظاهری در میگوی پاشفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه شده با سطوح مختلف ماکرو جلبک گراسیلاریا (*Gracilaria pygmaea*). فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات. ۶ (۳): ۱۱۲-۱۰۵.
- بی‌تا س.، اکبری پ.، سلطانی ف. ۱۳۹۶. تأثیر سین‌بیوتیک Biomin Imbo بر عملکرد رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه بچه‌ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*). نشریه دامپزشکی (پژوهش و سازندگی). ۱۱۴ (۱): ۳۵-۲۳.
- قانڈنيا ب.، میربخش م.، جلیل ذریه زهرا س. م. ۱۳۹۹. تأثیر جیره حاوی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* IS02 بر شاخص‌های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی. نشریه علمی توسعه آبزی پروری. ۱۱۴ (۳): ۹۹-۸۷.
- قرنجیک ب. م.، روحانی قادیکالایی ک. ۱۳۸۹. اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۷۰ صفحه.
- واعظی م. آ.، اسماعیلی فریدونی ا.، مناف فر ر.، امینی ک. ۱۳۹۷. بررسی تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های ایمنی‌شناختی همولنف و آنزیم‌های گوارشی بچه شاه‌میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) (فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. ۶ (۳): ۳۵-۶۰.
- Adel M., El-Sandy A.F. M., Yeganeh S., Dadar M., Giri S. S. 2017.** Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9(2), 150-156.
- Adilah R.N., Chiu S.T., Hu S. Y., Ballantyne R., Happy N., Cheng A.C., Liu C.H. 2022.** Improvement in the probiotic efficacy of *Bacillus subtilis* E20-stimulates growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via encapsulation in alginate and coated with chitosan. *Fish & Shellfish Immunology* 125 (4), 74-83.
- Akbary P., Adeshina I., Jahanbakhshi A. 2020.** Growth performance, digestive enzymes, antioxidant activity and immune responses of *Litopenaeus vannamei* fed with *Jania adhaerens* J.V. Supplemented diet against *Photobacterium damsela* infection. *Animal Feed Science and Technology* 270(2), 114696-11473.
- Akbary P., Ajdari A., Ajang B. 2023.** Growth, survival, nutritional value and phytochemical, and antioxidant state of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed with premix extract of brown *Sargassum ilicifolium*, *Nizimuddinina zanardini*, *Cystoseira indica*, and *Padina australis* macroalgae. *Aquaculture International* 31(1), 681-701.
- Anand P. S., Kohli M. P. S., Roy S. D., Sundaray J. K., Kumar S., Sinha A., Pailan G. H., Kumar Sukham M. 2013.** Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 392, 59-68
- Arumugama P., Murugan M., Kamalakannan S., Murugan K. 2017.** Determination of Various Bioactive Potential of *Stoechospermum marginatum* (C. Agardh) Kutzing in vitro. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research* 5(4), 145-152.
- Banerjee K., Mitra A., Mondal K. 2010.** Cost-effective and eco-friendly shrimp feed from red seaweed *Catenella repens* (Gigartinales: Rhodophyta). *Current Biotica* 8(1), 23-43.
- Borges E., Pompermayer Machado L., Louzã A., Ramaglia A., Santos M., Augusto A. 2024.** Physiological effects of feeding whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) with the fresh macroalgae *Chaetomorpha clavata*. *Aquaculture Reports* 37(1-3), 102222.
- Butt U.D., Lin N., Akhter N., Siddiqui T., Li S., Wu, B. 2021.** Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 114(1-4), 263-281.

- Castillo S., Rosales M., Pohlenz C., Gatlin D.M. 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenopsocellatus*. *Aquaculture* 433, 6-12
- Chitsaz H., Oraji H., Keramat Amirkolaie A., Akrami R. 2018. Effect of garlic peel on haematological, biochemical and digestive enzyme activity in beluga juvenile (*Huso huso*). *Iran. Journal of Aquatic Animal Health* 4(1), 13-28.
- Chojnacka K.W., Agnieszka S., Zuzanna W., Lukazy T. 2012. Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts -the Prospects for the Application *the Open Conference Proceedings Journal* 3(2), 22:20-28
- Chouhury S., Sree A., Mukherjee S.C., Pattnik P., Bapuji M. 2005. In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against Fish Pathogens. *Asian Fish Science* 18(3), 85-294.
- Dazy M, Jung V., Férard J. F., Masfaraud J. F. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74(1), 57-63.
- Decamp O., Moriarty D.J.W., Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research* 39(4), 334-338
- Furue M., Hidalgo M. C., López A., García-Gallego M., Morales A. E., Domenzain A., Domezain J., Sanz, A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study, *Aquaculture* 20(1-2), 391-398.
- Gruber C., Bui-Chau-Truc D., Kesselring J.C., Nguyen N.D., Standen B., Wein S. 2023. Diet-Independent Positive Effects of a Multi-Species Probiotic on the Growth Performance and Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in White Leg Shrimp. *Animals* 13(3), 331-338
- Harikrishnan R., Kim J-S., Kim M-C., Balasundaram C., Heo, M-S. 2011. *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. *Experience Parasitology* 129(3), 260-265.
- Jimenez-Escrig A., Sanchez-Muniz F. J. 2000. Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 20(4), 585-598.
- Keysami M.A., Mohammadpour M., Saad C.R. 2012. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) at different methods of administration to the feed. *Aquaculture International* 20(3), 499-511.
- King J. 1972. Practical clinical enzymology, (D' Van Nostrand Company New York), pp. 250
- Lara-Flores M. 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology* 2 (1), 471-478.
- Lim S.Y., Loo K.W., Wong W.L. 2019. Synergistic antimicrobial effect of a seaweed-probiotic blend against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12(10), 906-917.
- Liu C.H., Chiu C.S., Ho P.L., Wang S.W. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto, *Journal of Applied Microbiology* 107(3), 1031-1041
- Liu K.F., Chiu C.H., Shiu Y.L., Cheng W., Liu C.H. 2010. 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.
- Liu W.C., Zhou S.H., Balasubramanian B., Zeng F.Y., Sun C.B., Pang H.Y. 2020. Dietary seaweed (Enteromorpha) polysaccharides improves growth performance involved in regulation of immune responses, intestinal morphology and microbial community in banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *Fish & shellfish Immunology* 104(1), 202-212.
- Mazlum Y., Yazıcı M., Sayın S., Habiboğlu O., Uğur S. 2021. Effects of two different macroalgae (*Ulva lactuca* and *Jania rubens*) species on growth and survival of juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as feed additive. *Marine Science and Technology Bulletin* 10(2), 154-162.
- Mazlum Y., Yazıcı M., Sayın S., Habiboğlu O., Uğur S. 2021. Effects of two different macroalgae (*Ulva lactuca* and *Jania rubens*) species on growth and survival of juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as feed additive. *Marine Science and Technology Bulletin* 10(2), 154-162.

- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M., Ringo E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302(1-2), 1-18.
- Meshkini S., Tafi A.A. 2016. Presentation and usage of immunostimulators in aquaculture. *Agricultural and Natural Resources Engineering*, 46(12), 50-55.
- Mirbakhsh M., Ghaednia B., Tabatabaee Bafroee A.S. 2022. 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(18), 2704224.
- Monier M.N., Kabary H., Elfeky A., Saadony S., El-Hamed N.N.B., AbdEissa M.E.H., Eissa E.S.H. 2023. The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani* infection. *Aquaculture International* 31, 3437-3455.
- Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233(1-4), 305-320.
- Novriadi R., Prihadi T., Saragih H., Standen B., Kesselring J. 2022. Well defined multi-species probiotic and enzyme combination outperforms traditional fermented probiotic applications in an intensive pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Culture System. *Journal of World Aquaculture Society* 54(1), 156-166.
- Omont A., Quiroz-Guzman E., Tovar-Ramirez D., Peña-Rodriguez A. 2019. Effect of diets supplemented with different seaweed extracts on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology* 31(2), 1433-1442.
- Peixoto M.J., Salas-Leitón E., Pereira L.F., Queiroz A., Magalhães F., Pereira R., Abreu H., Reis P. A., Magalhães Gonçalves J.F., de Almeida Ozório R.O. 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports* 3, 189-197.
- Pereira, L. 2012. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: Pomin V.H. Seaweed: Ecology, nutrient composition and medicinal uses. Pomin V.H, editor. New York: Nova Science.
- Perera E., Moyano F. J., Rodríguez-Viera L., Cervantes A., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M. 2010. In vitro digestion of protein sources by crude enzyme extracts of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) hepatopancreas with different trypsin iso enzyme patterns. *Aquaculture* 310(1-2), 178-185.
- Putra D.F., Rahmawati M., Abidin M. Z., Ramlan R. 2019. Dietary administration of sea grape powder (*Caulerpalentillifera*) effects on growth and survival rate of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 348, 012100
- Rabiei R., Asadi M., Sohrabipour J., Nejadstari T., Majd A. 2007. Algae species diversity of *Gracilariasalicornia* on the Persian Gulf Coast-Qeshm Island. *Journal of Research Construction* 20(1), 43-57.
- Rajapakse N., Kim, S. K. 2011. Nutritional and digestive health benefits of seaweed. *Advances in Food and Nutrition Research* 64, 17-28.
- Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167(3-4), 301-313.
- Sathivel A., Raghavendran H. R. B., Srinivasan P., Devaki, T. 2008. Antiperoxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. *Food Chemistry and Toxicology* 46(10), 3262-3267.
- Tabarsa M., Rezaei M., Ramezanpour Z., Waaland J. R. 2012. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(12), 2500-2506.
- Tacon A., Cody J., Cnquest L., Divakaran S., Forster, I., Decamp, O. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed

- different diets. *Aquaculture Nutrition* 8(2), 121-137.
- Tsuge K., Okabe M., Yoshimura T., Sumi T., Tachibana H., Yamada, K. 2004.** Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague-Dawley rats. *Food Science and Technology Research* 10(2), 147-151
- Waché Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V., Labbé L. 2006.** Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258(1-4), 470-478.
- Xue M., Wen C., Liang H., Ding M., Wu Y., Li X. 2016.** In vivo evaluation of the effects of commercial Bacillus probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. *Aquaculture Research* 47, 1661-1669.
- Yalcin S., Uzun M., Karakas O., Baskan K.S., Okudan E. S., Apak, M. R. 2021.** Determination of total antioxidant capacities of algal pigments in seaweed by the combination of highperformance liquid chromatography (HPLC) with a cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay,” *Analytical Letters* 54, 2239-2258.
- Yang C., Chen N., Lu L., Chen S., Lai C. 2014.** Effect of mushroom Beta Glucan on immune and haemocyte response in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture Research Development* 5(6), 275.
- Zhang Z., Shi X., Wu Z., Wu W., Zhao Q., Li E. 2023.** Macroalgae Improve the Growth and Physiological Health of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition* 2023, 8829291.
- Zhou Z., Pan S., Wu S. 2020.** Modulation of the growth performance, body composition and nonspecific immunity of crucian carp *Carassius auratus* upon *Enteromorpha prolifera* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules* 147, 29-33.
- Ziaei-Nejad S., Rezaei M. H., Takami G. A., Lovett D. L., Mirvaghefi A.R., 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., 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.

## Investigation of growth performance and digestive enzymes whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with combined extract of brown macroalgae (MPE) and the single-cell probiotic *Bacillus subtilis*

Paria Akbary\*<sup>1</sup>, Jamile Mirozehi<sup>1</sup>, Zahra Mirozehi<sup>1</sup>, Amir Aramoon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

<sup>2</sup>Agricultural Research Educations and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Chabahar Offshore Fisheries Research Center, Chabahar, Iran.

\*Corresponding author: paria.akbary@gmail.com

Received: 11.Jul.2024

Accepted: 3.Sep.2024

### Abstract

The study of the effects of macroalgae extract and probiotics of the *Bacillus* species on the Pacific white shrimp for improving aquaculture practices, enhancing shrimp health and growth, effectively managing diseases, and promoting sustainability in the industry is vital. These findings could lead to significant advancements in shrimp farming and contribute to the overall success of aquaculture. This research examines the combined effect of a blend of brown macroalgae extracts (*Padina australis*, *Sargassum ilicifolium*, and *Stoechospermum marginatum*) and the single-cell probiotic (*Bacillus subtilis* ISO) on the growth performance and digestive enzyme activity of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. A total of 2400 post-larvae with an average weight of  $1.02 \pm 28.9$  mg were randomly divided into eight groups of 100 shrimp each (with three replicates per group). The control group received a diet without macroalgae extract (MPE) or probiotic (P), while the other groups received diets containing different amounts of macroalgae extract ( $15 \text{ kg}^{-1}$ ) and different concentrations of probiotic (1, 2 and 3 g  $100 \text{ g}^{-1}$  diet). Some groups also received combinations of the macroalgae extract and the probiotic at fixed concentrations. This feeding regimen lasted for 60 days. Spectrophotometer kits and devices were used to measure the activity of digestive enzymes. The results showed that the groups fed with  $P_2$ +MPE and  $P_3$ +MPE had the highest specific growth rates, final weights and weight gains, showing significant differences when compared with the control group and other experimental groups ( $P < 0.05$ ). In addition, these two groups also had the lowest feed conversion ratios. However, the survival rates of the experimental groups were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The highest enzyme activities were found in the group receiving  $P_2$ +MPE, with lipase at  $8.33 \pm 11.0 \text{ U mg}^{-1}$  protein, amylase at  $543.33 \pm 15.27 \text{ U mg}^{-1}$  protein and protease at  $488.66 \pm 10.21 \text{ U mg}^{-1}$  protein ( $P < 0.05$ ). Overall, the combined use of brown macroalgae extract at a concentration of 2 g  $100 \text{ g}^{-1}$  diet resulted in improved growth performance and increased digestive enzyme activity in white leg shrimp.

**Keywords:** Extract of macroalgae premix, Single-cell probiotics, *Litopenaeus vannamei*, Growth performance, Digestive enzyme