اثر عصاره اتانولی جلبک قهوه ای *Sargassum angustifolium* بر عملکرد رشد، درصد بقاء، و مقاومت در برابر ویبریوزیس (*Vibrio harveyi*) در میگوی پا سفید غربی *Litopenaeus vannamei*

عقیل دشتیان نسب[۱]*، مهرزاد مصباح[۲]، رحیم پیغان[۲]، شاپور کاکولکی[۳]

*adashtiannasab@gmail.com

۱- دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۲- گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
۳- بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۳

چکیده

در این مطالعه اثر عصاره الکلی جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* بدست آمده از سواحل خلیج فارس بر رشد و درصد بقاء بچه میگوی سفید غربی(وانامی) *Litopenaeus vannamei* در مواجهه با باکتری *Vibrio harveyi* بررسی شد. آرتمیا با پودر عصاره جلبک غنی سازی شد، سپس به بچه میگوهای وانامی مورد پرورش در ۵ گروه مختلف شامل C- (آرتمیای غنی نشده، فاقد باکتری)، کنترل مثبت +C (آرتمیای غنی نشده، واجد باکتری)، T_1 (آرتمیای غنی شده با $mg\ l^{-1}$ ۲۰۰ عصاره جلبک و واجد باکتری)، T_2 (آرتمیای غنی شده با $mg\ l^{-1}$ ۴۰۰ عصاره جلبک و واجد باکتری)، T_3 (آرتمیای غنی شده با $mg\ l^{-1}$ ۶۰۰ عصاره جلبک و واجد باکتری)، خورانده شد. یک هفته پس از آغاز پرورش، همه تیمارها به جز کنترل منفی به مدت ۱۵ دقیقه در ظرفی که حاوی باکتری VH به میزان $CFU\ ml^{-1}$ ۱/۵ ×۱۰^۸ بود قرار گرفتند و سپس به محیط پرورش برگردانده شدند. پس از آن در روزهایی که تعویض آب صورت می گرفت به میزان ۱۰ میلی لیتر باکتری VH با دز $CFU\ ml^{-1}$ ۱/۵ × ۱۰^۷ به محیط کشت میگوها اضافه می شد. میگوهای کنترل منفی بیشترین درصد بقاء (۴/۳± ۸۶/۶٪)، بیشترین نرخ رشد ویژه (۱۱/۳۳٪) و کمترین بار آلودگی باکتریایی($CFU\ g^{-1}tissue$ ۱۰^۳× ۰/۰۳± ۰/۵) بود، در حالیکه کمترین درصد بقاء (۳۳/۳٪)، کمترین نرخ رشد ویژه (۹/۹۰٪) و بیشترین بار آلودگی باکتری ($CFU\ g^{-1}tissue$ ۱۰^۵×۰،۰۵± ۳. ۴) در گروه کنترل مثبت دیده شد و این تفاوت معنی دار بود ($p<$ ۰/۰۵). درصد بقاء و نرخ رشد ویژه در سایر گروههای تیماری به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل مثبت و کمتر از گروه کنترل منفی بوده و بار آلودگی باکتری نیز کمتر از گروه کنترل مثبت و بیشتر از گروه کنترل منفی بود ($p<$ ۰/۰۵). در بین گروههای تیماری نیز گروه T_2 که از آرتمیای غنی شده با $mg\ l^{-1}$ ۴۰۰ عصاره جلبک تغذیه شده بودند، نتایج بهتری نشان داد.

لغات کلیدی: *Sargassum angustifolium*، عصاره الکلی، *Litopenaeus vannamei*، *Vibrio harveyi*، رشد، بقاء

*نویسنده‌مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

مقدمه

طی چند دهه گذشته مصرف آبزیان با درخواست بالایی همراه بوده است که این امر باعث افزایش تولید آبزیان شده است. اما با وجود افزایش تولید، تاکنون مزارع پرورش میگو به خاطر بروز بیماریها دچار خسارات اقتصادی زیادی شده اند. بنابراین پیشگیری از بیماریها در مزارع پرورش میگو یکی از مهمترین ارکان موفقیت این صنعت است. یکی از فاکتورهای کلیدی و تعیین کننده موفقیت پرورش میگو استفاده از پست لاروهای با کیفیت در ذخیره سازی است و برای کاهش مشکلات و نگرانیهای ناشی از بروز بیماریها و رسیدن به یک تولید بالا و پایدار، بایستی پست لارو با کیفیت بالا ذخیره سازی شود. لذا از هورمونها، آنتی بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها و چند نوع مواد شیمیایی دیگر به عنوان محرک رشد، اثرات ضدمیکروبی و اهداف دیگر در سیستم پرورش آبزیان مورد استفاده قرار گرفته است (Jayaprakas & Sambhu, 1996). هرچند مواد شیمیایی ذکر شده دارای اثرات مثبتی بر ماهی و میگو داشته-اند (Sambhu, 1996)، اما به دلیل ایجاد باقیمانده دارویی در بافت‌ها و عضلات ماهی و میگو نمی‌توان در پرورش تجاری آبزیان پیشنهاد کرد. چند سالی است که دانشمندان به دنبال جایگزین این مواد شیمیایی کنکاش می‌کنند. هم اکنون از جلبک‌های دریایی به دلایل داشتن خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی (دشتیان نسب و همکاران ،۱۳۸۸ Hellio *et al.*, 2004; Bansemir *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2006; Manilal *et al.*, 2009; Lipton *et al.*, 2009; Selvin *et al.*, 2011 Ghaednia *et al.*, 2011) و همچنین داشتن ترکیبات بیولوژیک فعال مثل کاروتنوئیدها، پلی ساکاریدها، پروتئین ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها و مواد معدنی (Kadam & Prabhasankar, 2010) به عنوان پتانسیلی برای افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، بهبود رشد و بازماندگی میگوها نام برده می‌شود (Raa, 1996).

گونه های متفاوت از جنس جلبک سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت بیولوژیکی هستند که پایه آنها قند فوکوز است و تاکنون خواص مهمی از قبیل خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد توموری نشان داده اند (Yeh *et al.*, 2006; Zhuang et *al.*, 1995). عصاره *S. muticum* می تواند رشد هر دو گروه باکتریهای گرم مثبت و منفی را مهار کند (Hellio *et al.*, 2001). میگوهایی که عصاره های *S. fusiforme* و *S. duplicatum* دریافت کرده بودند در برابر باکتری‌های *V. harveyi* و *V. alginolyticus* افزایش مقاومت نشان دادند (Huang *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2006). از طرفی در مطالعات قبلی ما مشخص شده بود که *S. latifulium* و *S. angustifolium* جداسازی شده از سواحل خلیج فارس باعث مهار باکتریهای پاتوژن انسانی و آبزیان می شوند (درخشش و همکاران ۱۳۹۰، Dashtiannasab *et al.*, 2012)، لذا ما فکر می کنیم استفاده ازعصاره جلبک قهوه‌ای *S. angustifolium* در غذای بچه میگوها بتواند باعث ارتقای رشد و افزایش بازماندگی میگوها در مواجهه با عوامل بیماریزا بشود.

مواد روش‌ها

جلبک قهوه ای دریایی *S. angustifolium* طی ماه‌های آبان و آذر از منطقه بین جزر و مدی ریشهر واقع در بندر بوشهر جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه ابتدا چندبار با آب دریا و سپس با آب شیرین به خوبی شستشو شد تا از نمک، شن، ماسه و سایر موارد تمیز شود، آنگاه قسمت‌های نکروز شده جلبک‌ها جداسازی و جلبک‌ها به مدت ۱۰ روز روی پارچه تمیز در سایه و دمای اتاق خشک شدند. پس از خشک شدن توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمدند. عصاره گیری جلبک‌ها به روش غوطه وری ۱۰ درصد جرمی–حجمی با استفاده از حلال اتانول ۱۰۰٪ (مرک-آلمان) انجام شد. ۳۰ گرم پودر جلبک به ظروف شیشه ای دردار منتقل شد سپس ۳۰۰ میلی لیتر اتانول به آن اضافه شد، شیشه چند بار به خوبی تکان داده شد، آنگاه به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. عصاره گیری در ۳ تکرار انجام شد، عصاره های حاصل پس از عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ با همدیگر مخلوط شده، در دستگاه تبخیر کننده چرخان (Rotary) و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

تغلیظ شده، زیر هود خشک شدند. عصاره های خشک شده (۱۰ گرم) در ۲ میلی لیتر اتانول حل شده و تا موقع استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

سیست آرتمیا فرانسیسکانا (INVE, Belgium) از یک مرکز تکثیر در استان بوشهر تهیه شد. سیست خشک آرتمیا طبق روش استاندارد (Sorgeloos *et al*., 2001) تفریخ شد. پنجاه گرم سیست آرتمیا در۱۰ لیتر آب دریای(ppt ۳۵) اتوکلاو شده، در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد و هوادهی شدید و یک رژیم نوری مداوم تفریخ شد. ۱۲ ساعت پس از تفریخ ناپلی ها با استفاده از خاصیت نورگرایی مثبت جمع آوری و با استفاده از صافی ۱۰۰ میکرونی و آب شیرین شستشو شدند.

ماده غنی ساز طبق روش Leger و همکاران (۱۹۸۷) با کمی تغییر شامل ۰/۱ گرم لستین، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب دریای استریل ولرم (۴۵ درجه سانتیگراد) و عصاره جلبک به نسبتهای مختلف ($mg\ l^{-1}$ ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰) بر اساس تیمارهای مختلف بود که به مدت ۱۰ دقیقه با همزن برقی هموژن شد.

به منظور غنی سازی از بطریهای پلاستیکی ۱/۵ لیتری استفاده شد. این بطریها حاوی ۹۰۰ میلی لیتر آب دریای استریل و ناپلی اینستار۲ با تراکم ۱۲۰-۱۰۰ ناپلی در میلی لیتر بود که ۱۰۰ میلی لیتر از ماده غنی سازی نیز به آن اضافه می شد دارای هوادهی ملایم بود به نحویکه ضمن حفظ میزان اکسیژن مورد نیاز، انتشار مواد غذایی هم در حد مناسب در محیط کشت وجود داشته باشد. هر تیمار دارای سه تکرار و طول مدت غنی سازی ۶ ساعت بود. ناپلیوس‌ها پس از غنی سازی در الک ۱۰۰ میکرونی شستشو شده و مستقیما مورد استفاده میگوها قرار می گرفتند یا اینکه تا استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد با هوادهی ملایم قرار می گرفتند.

از باکتری (VH) *V. harveyi* PTCC 1755 که قبلا از میگوهای تلف شده جداسازی شده بود و در آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای پژوهشکده میگوی کشور نگهداری می شد به عنوان سویه حدت دار در تستهای مواجهه باکتری با میگوها استفاده شد.

تعداد ۱۵۰۰ عدد پست لارو ۱۰ میگوی وانامی (*L. vannamei*) دارای گواهی سلامت از دامپزشکی استان مبنی بر عاری بودن از بیماری‌های ویروسی از یک مرکز تکثیر بخش خصوصی در استان بوشهر خریداری شد. پس از انتقال میگوها به بخش بهداشت و بیماریهای پژوهشکده میگو جهت سازگاری با محیط در ۲ تانک ۵۰۰ لیتری در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد و شوری ۴۰ppt به مدت ۳ روز نگهداری شدند و در این مدت از نظر وجود بیماریهای اثر گذار به خصوص ویبریوزیس نیز پایش شد. در دوره سازگاری میگوها از غذای پایه (غذای فرموله شده کارخانه شرکت هوواش) دو بار در روز تغذیه می شدند. پس از گذشت ۳ روز میگوها بیومتری شده (طول اولیه= ۲/۴ mm ±۱۰/۶ و وزن اولیه= ۰/۸۸mg ± ۶/۲) و به ۵ گروه تقسیم شدند: کنترل منفی (-C) که از غذای پایه و آرتمیای غنی سازی شده با صفر میلی گرم عصاره جلبک(آرتمیای غنی نشده نامگذاری شد) استفاده می کردند و با باکتری پاتوژن (VH) روبرو نمی شدند، کنترل مثبت (+C) که از غذای پایه و آرتمیای غنی نشده استفاده می کردند و با باکتری پاتوژن (VH) روبرو می شدند، تیمار ۱ (T_1) که از غذای پایه و آرتمیای غنی سازی شده با $200mg\ l^{-1}$ عصاره جلبک استفاده می کردند و با باکتری پاتوژن (VH) روبرو می شدند ، تیمار ۲ (T_2) که از غذای پایه و آرتمیای غنی سازی شده با $400mg\ l^{-1}$ عصاره جلبک استفاده می کردند و با باکتری پاتوژن (VH) روبرو می شدند، تیمار ۳ (T_3) که از غذای پایه و آرتمیای غنی سازی شده با $600mg\ l^{-1}$ عصاره جلبک استفاده می کردند و با باکتری پاتوژن (VH) روبرو می شدند.

میگوهای گروههای مختلف روزانه سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۴ و ۲۴ به ترتیب به میزان ۲۰٪، ۵۰٪ و ۳۰٪ غذای مورد نظر دریافت می کردند. در ساعت ۸ و ۲۴ از آرتمیای غنی سازی شده و در ساعت ۱۴ از غذای پایه استفاده می شد. هر تیمار دارای ۳ تکرار و هر تکرار دارای ۳۰ عدد بچه میگو بود. دمای آب در طول دوره پرورش ۲±۲۹ و شوری آب ppt ۲ ±۴۰ بود و غذای مصرف نشده و مدفوع میگوها روزانه سیفون می شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

در پایان ۳۰ روز پرورش با شمارش میگوهای زنده و بر اساس روش (Immanuel *et al.*, 2001) درصد بازماندگی میگوها (فرمول ۱) محاسبه شد. شاخص های رشد در هر تیمار با اندازه گیری طول و وزن نهایی میگوها محاسبه شد. میزان وزن کسب کرده طی دوران پرورش از طریق کم کردن وزن اولیه از وزن نهایی به دست آمد و نرخ رشد ویژه به روش (Immanuel *et al.*, 2001) و از طریق فرمول ۲ محاسبه شد.

۱. بازماندگی(٪) = ۱۰۰ × (تعداد میگوی زنده ثانویه)/ تعدادمیگوی اولیه

۲. نرخ رشد ویژه (SGR)(٪) =۱۰۰ × (لگاریتم طبیعی وزن ثانویه- لگاریتم طبیعی وزن اولیه) / روزهای پرورش

یک هفته پس از آغاز پرورش، همه تیمارها به جز کنترل منفی به مدت ۱۵ دقیقه در ظرفی که حاوی باکتری VH به میزان $CFU\ ml^{-1}$ ۱/۵ ×۱۰^{۸} بود قرار گرفتند و سپس به محیط پرورش برگردانده شدند. پس از آن در روزهایی که تعویض آب صورت می گرفت به میزان ۱۰ میلی لیتر باکتری VH با دز $CFU\ ml^{-1}$ ۱/۵ × ۱۰^{۷} به محیط کشت میگوها اضافه می شد.

در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پرورش به صورت تصادفی از هر تکرار ۵ عدد بچه میگو صید شده و پس از ضدعفونی سطح بدن با ppm ۵۰ فرمالین (به منظور حذف باکتریهای سطح بدن) به مدت ۵ دقیقه و سپس شستشو با آب استریل به مدت ۳۰ ثانیه (به منظور حذف باکتریهای مانده و باقیمانده ماده ضدعفونی)، بچه میگوها به صورت استریل در ۵ میلی لیتر نرمال سالین استریل هموژن شده و سپس به روش لوله های متوالی رقت تهیه شد، ۰/۵ میلی لیتر از آخرین رقت به کمک پیپت استریل برداشت و روی محیط کشت TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts sucrose agar) در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت و هر تیمار در ۳ تکرار انکوبه شد. پس از دوره اکوباسیون تعداد کلونی باکتریهای رشد کرده بوسیله شمارشگر دیجیتال شمارش شد و از روش فرمول زیر تعداد کلونیها در هر گرم بافت میگو محاسبه گردید.

تعداد باکتری ($CFU\ g^{-1}$) = تعدادکلونیهای شمارش شده × فاکتور رقت/ وزن نمونه (g)

در این تحقیق از نرم افزار SPSS (Version 18) برای انجام کارهای آماری استفاده شد.تجزیه و تحلیل اطلاعات از روش آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) انجام شد و برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن و تعیین وجود اختلاف معنی دار در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده گردید.

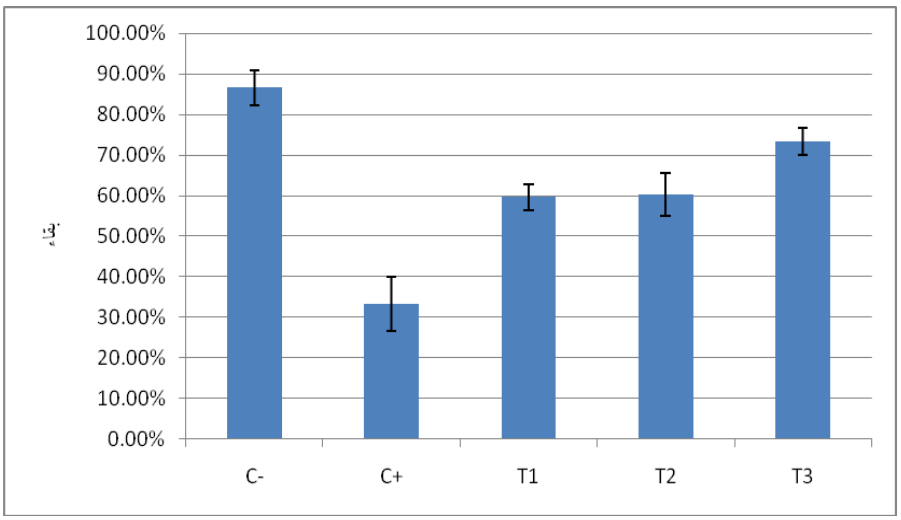
نتایج

بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) تغذیه شده با آرتمیای غنی سازی نشده و پرورش یافته در محیط فاقد باکتری (-C) پس از ۳۰ روز پرورش دارای بیشترین درصد بقاء بودند (۴/۳ ± ۸۶,۶٪) که با سایر گروهها دارای تفاوت معنی دار بود ($p<$ ۰/۰۱). اما میگوهایی که از آرتمیای غنی سازی نشده استفاده کرده بودند و در محیط دارای باکتری (VH) قرار گرفته بودند (+C)، پس از ۳۰ روز پرورش دارای کمترین درصد بقاء بودند (۶/۶ ± ۳۳/۳٪) که این تفاوت با تمام گروهها از نظر آماری معنی دار بود ($p<$ ۰/۰۱). میگوهای پرورش یافته در آب دریای واجد باکتری (VH) و تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با غلظتهای مختلف عصاره جلبک (SA) (T1-T3) بقاء آنها به ترتیب ۳/۳ ± ۵۹/۶٪ ، ۵/۲ ± ۶۰/۳۳٪ و ۳/۴ ± ۷۳/۳٪ بود (نمودار۱) که اختلافهای آنها بین T1 و T2 معنی دار نبود ($p<$۰/۰۵) ولی بین گروه T3 که از بالاترین غلظت عصاره ($mg\ l^{-1}$ ۶۰۰) و سایر گروهها معنی دار بود ($p<$ ۰/۰۵).

بیشترین مقدار وزن کسب شده در بچه میگوهای گروه کنترل منفی (-C) که با آرتمیای غنی سازی نشده تغذیه شده بودند و در معرض باکتری (VH) قرار نگرفته بودند، دیده شد (۲/۸ ±۱۷۹/۸میلی گرم) و اختلاف با سایر گروههایی که در معرض باکتری (VH) قرار گرفته بودند معنی دار بود (۰/۰۵ >p). کمترین وزن کسب شده در بچه میگوهایی بدست آمد که از آرتمیای غنی نشده استفاده کرده بودند و در معرض

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

باکتری قرار گرفته بودند (+C) که این اختلاف نیز با سایر گروهها معنی دار بود ($p< ۰/۰۵$).



نمودار۱: درصد بقاء بچه میگوهای سفید غربی تغذیه شده با آرتمیای غنی نشده و غنی شده با عصاره جلبک (SA)، پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری VH پس از ۳۰ روز دوره پرورشی. بارها نمایانگر انحراف معیار است.

از طرفی در گروههای تیمار (T1-T3) که از آرتمیای غنی شده با عصاره جلبک (SA) با غلظتهای مختلف استفاده کرده بودند، تیماری که بیشترین غلظت عصاره جلبک داشت (T3)، از کمترین میزان وزن کسب کرده برخوردار بود (۲/۷± ۱۴۶/۸)، هر چند این میزان وزن کسب کرده از گروه کنترل مثبت بیشتر بود ولی از گروه کنترل منفی و سایر گروههای تیماری به طور معنی داری کمتر بود ($p< ۰/۰۵$). در بین سایر تیمارها گروهی که آرتمیای غنی شده با غلظت $mg\ l^{-1}$ ۴۰۰ استفاده کرده بودند از گروهی که با آرتمیای غنی شده با غلظت $۲۰۰mg\ l^{-1}$ تغذیه شده بودند وزن بیشتری بدست آورده بودند که اختلاف معنی دار بود ($p< ۰/۰۵$).

نرخ رشد ویژه بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) پرورش یافته در محیط فاقد باکتری (VH) یا گروه کنترل منفی (-C) از همه گروهها بیشتر بود. از طرفی بچه میگوهای تغذیه شده با آرتمیای غنی نشده و پرورش یافته در محیط دارای باکتری (VH) دارای کمترین میزان نرخ رشد ویژه پس از روز دوره آزمایش بودند، که این دو گروه دارای تفاوت معنی داری با هم بودند ($p<۰/۰۵$). در بین سایر تیمارهایی که از آرتمیای غنی شده با عصاره جلبک (SA) تغذیه کرده بودند و در معرض باکتری (VH) قرار گرفته بودند (T1-T3). گروهی که از بیشترین غلظت عصاره جلبک در غنی سازی آرتمیا استفاده کرده بود دارای کمترین نرخ رشد ویژه بود و گروهی که از آرتمیای غنی شده با غلظت $۴۰۰mg\ l^{-1}$ استفاده کرده بود دارای بیشترین میزان نرخ رشد ویژه بود. نتایج نرخ رشد ویژه و برخی دیگر از شاخصهای رشد در جدول ۱ به صورت میانگین(± انحراف معیار) ارائه شده است.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

جدول۱: طول و وزن اولیه، طول و وزن نهایی، وزن کسب شده و درصد نرخ رشد ویژه در بچه میگوهای سفید غربی تغذیه شده با آرتمیای غنی نشده و غنی شده با عصاره جلبک (SA)، پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری VH

گروه	تعریف گروه	طول اولیه(cm)	وزن اولیه (mg)	طول نهایی(cm)	وزن نهایی (mg)	وزن کسب کرده (mg)	SGR%
C_-	کنترل منفی	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۴۵ ±.۰/۶۲ ^{a}	۱۸۶ ± ۴/۵ ^{a}	۱۷۹/۸ ± ۲/۸^{a}	۱۱/۳۳ ± ۰/۳۷^{a}
C_+	کنترل مثبت	۱/۰۶ ±۰/۲۴ ^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۳۸ ±۰/۵۴^{ab}	۱۲۱ ±۶/۴^{b}	۱۱۳/۸ ± ۴/۳ ^{b}	۹/۹۰ ±۰/۲۴^{b}
T_1	۲۰۰mg l^{-1}	۱/۰۶ ±۰/۲۴ ^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۸۸ ±۰/۶۲ ^{ab}	۱۶۶ ± ۳/۸^{c}	۱۵۹/۴ ± ۳/۱ ^{c}	۱۰/۹۶ ±۰/۳۶ ^{c}
T_2	۴۰۰mg l^{-1}	۱/۰۶ ±۰/۲۴ ^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۹۸ ±۰/۴۷ ^{ab}	۱۷۳ ± ۵/۳^{d}	۱۶۶/۸ ± ۳/۹ ^{d}	۱۱/۱۰ ±۰/۲۲^{ca}
T_3	۶۰۰mg l^{-1}	۱/۰۶ ±۰/۲۴ ^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۷۵ ±۰/۵۷^{b}	۱۵۳ ± ۴/۲^{e}	۱۴۶/۵ ±۲/۷ ^{e}	۱۰/۶۸ ±۰/۲۶^{bc}

حروف لاتین مشابه در ستون‌ها نشانه عدم اختلاف معنی دار است (p< ۰/۰۵).

میزان بار آلودگی ویبریویی در بافت هموژن شده بچه میگوی سفید غربی در گروه کنترل منفی (بدون عصاره جلبک و بدون قرار گرفتن در معرض باکتری) در دهم پرورش $CFU\ g^{-1}$ ۰/۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۳} بود که در روزهای بیستم و سی ام پرورش با کمی افزایش به ترتیب به $CFU\ g^{-1}$ ۰/۴ ±۰/۰۲×۱۰^{۳} و $CFU\ g^{-1}$ ۰/۵ ±۰/۰۳×۱۰^{۳} رسید، این نتیجه نشان می دهد که باکتری VH به طور طبیعی در محیط پرورش میگوها (آب دریا) وجود دارد. بار آلودگی باکتریایی (VH) در گروه کنترل مثبت (بدون عصاره جلبک و با قرار گرفتن در معرض باکتری) در هر ۳ موقع نمونه گیری از سایر گروهها به جز کنترل منفی بیشتر بود. در گروههای تیمار (T1-T3) کمترین بار آلودگی باکتریایی مربوط به تیمار ۳ (گروهی که با آرتمیای غنی شده با بیشترین غلظت عصاره جلبک تغذیه شده بودند) در حدود $CFU\ g^{-1}$ ۱ /۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۴} در روز دهم، $CFU\ g^{-1}$ ۱/۵ ±۰/۰۵×۱۰^{۴} در روز بیستم و $CFU\ g^{-1}$ ±۰/۰۷× ۱۰^{۴} ۱/۴ در روز سی ام پرورش بود. ارزیابی میزان بار باکتریایی پاتوژن (VH) در بافت هموژن شده بچه میگوهای موجود در گروههای مختلف کنترل و تیمار در روزهای مختلف پرورش در جدول ۲ به صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است.

جدول ۲: بار باکتریایی بر حسب $CFU\ g^{-1}$ در بافت هموژن شده بچه میگوهای پرورش یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری VH در فازهای مختلف دوره آزمایش

گروه	تعریف گروه	روز ۱۰	روز ۲۰	روز ۳۰
C_-	کنترل منفی (بدون باکتری)	۰ /۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۳}	۰/۴ ±۰/۰۲×۱۰^{۳}	۰/۵ ±۰/۰۳×۱۰^{۳}
C_+	کنترل مثبت	۳ /۲ ±۰/۰۶×۱۰^{۵}	۲ /۸ ±۰/۰۷×۱۰^{۵}	۳ /۴ ±۰/۰۵×۱۰^{۵}
T_1	۲۰۰mg l^{-1}	۱ /۲ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۱/۵ ±۰/۰۷×۱۰^{۴}	½ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}
T_2	۴۰۰mg l^{-1}	۱ /۴ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۱/۴ ± ۰/۰۵×۱۰^{۴}	۱/۷ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}
T_3	۶۰۰mg l^{-1}	۱/۲ ±۰,۰۲×۱۰^{۴}	۱/۵ ±۰/۰۴×۱۰^{۴}	۱/۴ ±۰/۰۷×۱۰^{۴}

بحث

به دلیل افزایش درخواستها برای آبزی پروری پایدار و استفاده از ترکیبات دوستدار طبیعت تحقیقات زیادی روی استفاده از عصاره یا پودر جلبکهای دریایی در تغذیه آبزیان شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از آرتمیای غنی شده توسط عصاره الکلی جلبک SA قادر است میزان وزن کسب شده و همچنین نرخ رشد ویژه در بچه میگوهای سفید غربی پرورش یافته در محیط دارای آلودگی باکتریایی نسبت به گروه کنترل مثبت که از این عصاره ها استفاده نمی کرد را افزایش دهد، همانطور که در مطالعه مشابهی عصاره جلبک‌های *Ulva lactuca, S.wightii* توانسته بود باعث افزایش وزن بچه میگوهای سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) در

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

شرایط آلودگی شود (Immanuel *et al*., 2004). همچنین این مطالعه نشان داد که این افزایش وزن بدست آمده با استفاده از عصاره جلبک SA وابسته به دز بوده و در دزهای پایین ($200 mg l^{-1}$ و $400 mg l^{-1}$) نسبت به دز بالاتر ($600 mg l^{-1}$) میزان افزایش وزن بیشتر بود. در مطالعات قبلی هم برخی محققین بیان کرده بودند که استفاده از عصاره جلبکهای مختلف یا پودر جلبکهای دریایی می تواند باعث بهبود رشد میگوها شود که وابسته به دز بوده است، مثلا در مطالعه Penaflorida و Golez (۱۹۹۶) مشاهده شد که میگوهای جوان وانامی (۲۰۰ میلی گرمی) که از جیره غذایی حاوی ۵٪ پودر جلبک *Kappaphycus alvarezii* استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل (۰٪) و گروه ۱۰٪ پودر جلبک مذکور بیشترین وزن بدست آورده بودند که Suarez-Garci (۲۰۰۶) از پودر جلبک یک نوع سارگاسوم به میزان ۴-۲ درصد یا پودر کلپ (*Macrosystis pyrifera*) به میزان ۴٪ به عنوان همبند (بایندر) در جیره غذایی میگوها استفاده کردند، نتیجه ای همانند گروه کنترل (۳٪ آلژینات خالص) بدست آوردند. Rivera و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کرده اند موقعی که ۱۰٪ از پودر جلبک کلپ در آب حل کرده و روی جیره غذایی میگو می پاشند باعث افزایش رشد می شود ولی با افزایش آن به میزان ۱۵ و ۲۰ درصد موجب کاهش رشد میگو می گردد. Gutirrez-Leyva (۲۰۰۶) دریافت که بهبود SGR (نرخ رشد ویژه) میگوی وانامی با فزایش سطح پودر کلپ یا سارگاسوم (۱و ۴ و ۷ و ۱۰٪) ایجاد می شود و بهترین نرخ رشد در میزان ۱۰٪ جلبک‌ها حاصل شد.

اینکه دقیقا چه ترکیباتی در جلبک‌های دریایی باعث افزایش رشد می‌شوند هنوز مشخص نشده است ولی سودمندی جلبکها در بهبود عملکرد جیره و افزایش رشد بیشتر به دلیل وجود ویتامین‌ها، مینرال‌ها، تعدیل کردن متابولیسم لیپیدها و بهبود جذب مواد غذایی مرتبط می دانند (Yone *et al*., 1986). تاثیر مثبت جلبکهای دریایی روی نرخ کارآیی پروتیین (PER) نیز گزارش شده است، استفاده از پودر جلبک *Ulva*، *Gracilaria cornea*، *S. wightii* نیز گزارش شده است (Nakagawa *et al*., 1986; Valante *et al*., 2006).

نتایج این مطالعه نشان داد بچه میگوهایی که از آرتمیای غنی شده با عصاره جلبک SA (همه غلظت‌ها) تغذیه شده بودند نسبت به گروهی که از عصاره جلبک استفاده نکرده بودند در برابر عامل ویبریوزیز (VH) مقاومت نشان داده و بازماندگی بیشتری داشتند، در این تحقیق مشخص شدکه بقای بچه میگوها نیز به دز عصاره جلبک وابسته است به طوریکه با افزایش غلظت جلبک از صفر میلی گرم به ۶۰۰ میلی گرم میزان بقای بچه میگوها نیز در برابر عامل ویبریوزیز از ۳۲٪ به ۷۲٪ افزایش پیدا کرد. همچنین این مطالعه نشان می دهد که میزان بار آلودگی باکتریایی در بدن میگوهای استفاده کرده از عصاره جلبک SA (تمام غلظتها) نسبت به میگوهای کنترل مثبت کاهش قابل ملاحظه ای دارد. Cruz-Suarez و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز گزارش کرده اند که بقای میگوهای وانامی تغذیه شده توسط جیره حاوی ۴-۲٪ پودر کلپ و *Sargassum* spp. به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بوده است. در چندین تحقیق گزارش شده که استفاده از مکملهای تغذیه ای جلبکی به صورت پودر یا عصاره توانسته باعث ارتقای سیستم ایمنی و بهبود بقای میگوها در چالش باکتریها شود (Chotigeat *et al*., 2004; Immanuel *et al*., 2004; Cheng *et al*., 2005). *برای نمونه*، میگوهای *Fenneropenaeus chinensis* تغذیه شده با عصاره جلبک *Sargassum fusiforme* به میزان $5 g Kg^{-1}$ و $10 g Kg^{-1}$ در برابر باکتری VH مقاومت نشان داده بودند (Huang *et al*., 2006). همچنین میگوهای وانامی که در عصاره جلبک *S. duplicatum* غوطه ور شده بودند، فعالیت فاگوسیتوزی و اثر پاک کنندگی باکتری *V.alginolyticus* توسط هموسیتها به میزان معنی داری افزایش یافته بود (Yeh *et al*., 2006). میگوهای ببری (*Penaeus monodon*) و ژاپنی (*Marsopenaeus aponicas*) تغذیه شده با عصاره خام فوکوییدان جداسازی شده از *S. polycystum* علاوه باکتری

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

در برابر بیماری ویروسی لکه سفید هم مقاوم شده بودند (Chotigeat *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 1998).
از دلایل بهبود درصد بقا و افزایش مقاومت میگوهای تغذیه شده با جلبک‌های قهوه ای به خصوص جنس سارگاسوم در برابر بیماری‌ها بیان شده که جلبک‌های قهوه‌ای عموما دارای ویتامین C بیشتری نسبت به سایر ماکروجلبک‌ها (سبز و قرمز) هستند (Cruz-Suarez *et al*., 2008). همچنین بخش زیادی از پلی ساکاری‌های موجود در گونه های مختلف جنس سارگاسوم توسط نوعی قند بنام فوکوز (یک نوع پلی ساکارید سولفاته) و سایر پلی ساکاریدهای سولفاته تشکیل شده است (FAO, 2003). این نوع پلی ساکاریدها به شدت تحریک کننده سیستم ایمنی بوده و با فعال کردن ماکروفاژها خاصیت ضدباکتریایی دارند (Lee *et al.*, 1995).

منابع

درخشش ب.، یوسف زادی م.، افشارنسب م.، یگانه و.و دشتیان نسب ع.، ۱۳۹۰، بررسی اثر ضدباکتریایی جلبکهای دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژنهای انسانی. فصلنامه طب جنوب، سال چهاردهم شماره ۱ ، صفحات ۲۲-۱۷.

دشتیان نسب ع.، افشارنسب م.، مهرابی م.ر. و یگانه و.، ۱۳۸۸ . بررسی اثرات جلبکهای دریایی در پیشگیری و کنترل بیماری لکه سفید در میگوی پا سفید غربی *Litopenaeus vannamei* . مجله علمی شیلات ایران، سال هیجدهم شماره۲، صفحات ۴۲-۳۵.

Bansemir A., Blume M., Schroder S. and Lindequist U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture., 252: 79–84.

Cheng W., Liu C.H., Kuo C.M. and Chen J.C., 2005. Dietary administration of sodium alignate enhance the immune ability of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology, 18 : 1-12.

Chotigeat W., Tongsupa Supamattaya S. and Phongdara A., 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture, 233: 23-30.

Cruz-Suarez Tapia Salazar M., Nieto Lopez M. and Rique D., 2008. A review of effects of macroalgae in shrimp feeds and co-culture. Program of Mariculture, University of Mexico. Pp. 304-333.

Dashtiannasab A., Kakoolaki S., Sharif Rohani M. and Yeganeh V., 2012. In vitro effects of *Sargassum latifolium* (Agardeh, 1948) against selected bacterial pathogens of shrimp. Iranian Journal of Fisheries Sciences 11:(4) 765-775.

FAO 2003. A guide to to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Papers No. 441. ISSN 0429-9345. FAO. Rome.

Ghaednia B., Mehrabi M. R., Mirbakhsh M., Yeganeh, V., Hoseinkhezri P., Garibi G. and Ghaffar J. A., 2011. Effect of hot water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fennerpenaeus indicus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(4): 616-630.

Gutirrez-Lyva R. (2006). Use of seaweed *Macrocystis pyrifera* and *Sargassum spp*. As ingredients in shrimp feed. Aquculture Nutrition, 8(2): 128-134.

Hellio C., De La Broise D., Dufosse L., Le Gal Y. and Bourgougnon N., 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: Potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environmental Research 52 (3): 231–247.

Hou W. Y. and Chen J. C., 2005. The imunostimulatory effect of hot water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunology, 19(1): 27-38.

Huang X. and Zhou H., 2006. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extract on vibriosis resistance and immune activity of

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shelfish Immunology. 20: 750-7.

Immanuel G., Palavesam A. and Peter Marian M., 2001. Effects of feeding lipid enriched Artemia nauplii on survival, growth, fatty acids and stress resistance of post larvae *Penaeus indicus*. Journal of Asian Fisheries Science, 14(4): 377-388.

Immanuel G., Vincybai V.C., Sivaram V., Palavesam A. and Marian M.P., 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236: 53–65.

Immanuel G., Citarasu T., Sivaram V., Babu M. and Palavesam A., 2007. Delivery of HUFA, probionts and biomedicine through bioencapsulated Artemia as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesity in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. Aquaculture International, 15:137–152.

Jayaprakas V. and Sambhu C., 1996. Growth response of white prawn, *Penaeus indicus* to dietary L-carnitine. Asian Fish Science, 9:209–219.

Jiann C.C., Su T. Y. and Chiu S. L. 2006. Administration of hot water extract of brown seaweed, *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 20: 332- 345.

Kadam S.U. and Prabhasankar P., 2010. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. Food Research International, 43: 1975–1980

Lee H.S., Jin S.H., Kim H.S. and Ryu B.H., 1995. Characteristic properties of fucoidan sulphate purified from Gompi, *Ecklonia stolonifera*. Korean Journal of Food Science Technology; 27(5):716 – 723.

Leger P.H., Bengston D.A., Simpson K.L. and Sorgeloos P., 1987. The use and nutritional value of Artemia as a food source. Oceanography and Marine Biology Annual Reviews, 24:521–623.

Lipton A.P., Pramitha V.S. and Jose J.J., 2009. Marine secondary metabolites (MSM) from macro algae enhance bacterial clearance in hemolymph of *Penaeus monodon*. The Israeil Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 61(1): 42–47.

Manilal A., Sujith S., Kiran G.S., Selvin J., Shakir C., Gandhimathi R. and Lipton A.P., 2009. Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from southwest coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. Annual Microbiology, 59(2): 207–219.

Miyashita K. and Hosokawa M., 2008. Beneficial health effects of seaweed carotenoid, fucoxanthin in marine nutraceuticals and functional foods. In: Barrow C., Shahidi F., (Eds.), Boca Raton, USA: CRC Press, 297-320.

Nakagawa H., Kasahara S. and Sugiyama J.,1986. Effect of Ulva meal supplement to diet on the lipid metabolism of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi, 52, 1887–1893.

Paul N.A., de Nys R. and Steinberg P.D., 2006. Chemical defense against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. Marine Ecological Programe Ser. 306: 87–101.

Penaflorida V. D. and Golez N. V. 1996. Use of seaweed meals from Kappaphycus alvarezii and Gracilaria heteroclada as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 143:393-401.

Raa J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science, 4(3): 229-288.

Sambhu C., 1996. Effect of hormones and growth promoters on growth and body composition of pearlsport, Etroplus suratensis and white prawn *Penaeus indicus*. Ph.D. Thesis. University of Kerala, India. 215 P.

Selvin J., Manilal A., Sujith S., Kiran G.S. and Lipton A.P., 2011. Efficacy of marine green alga Ulva fasciata extract on the management

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

of shrimp bacterial diseases. Latin America Journal of Aquaculture Research, 39 (2): 197–204.

Sorgeloos P., Dhert P. and Candreva P., 2001. Use of brine shrimp, *Artemia sp.*, in marine fish larviculture. Aquaculture, 200:147-159.

Suarez-Garcia H.A. 2006. Effect of alginate and two seaweeds *sargassum sp.* and Macrocystis pyrifera as binder in shrimp *Litopenaeus vannamei* pellet mill. Aquculture Nutrition, 8(4): 418-426.

Takahashi Y., Uehara K., Watanabae R., Okaumura T., Yamashita T. and Omura H., 1998. Efficacy of oral administration of shrimp in Japan. In: Flegel TW., (ed). Advances in shrimp biotechnology. Bangkok: National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology; p. 171-173.

Valante L.M., Goueia A., Rema P., Motas J. and Gonez E.F., 2006. Evaluation of three seaweeds Gracilaria bursa-pastoris, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European seabass juveniles. Aquaculture, 252:85-91.

Yeh S.T., Lee C.S. and Chen J. C., 2006. Administrasion of hot water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shelfish Immunology, 20: 332-345.

Yone Y., Furuichi M. and Urano K., 1986. Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and Ascophyllum nodosum on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi, 52: 1817–1819.

Zhuang C., Itoh H., Mizuno T. and Ito H., 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed Umitoranoo (*Sargassum thunbergii)*. Bioscience Biotechnology Biochemical, 59: 563– 567.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]

The effects of brown algae *Sargassum angustifolium* extract on growth performance, survival and Vibriosis resistance in shrimp *Litopenaeus vannamei*

Dashtiannasab A.[1*]; Mesbah M.[2]; Peyghan R.[2]; Kakoolaki S,[3]

* adashtiannasab@gmail.com

1. Student of Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
2. Veterinary Medicine College, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
3. Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran

Key words: *Sargassum angustifolium*, Ethanolic Extract, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio harveyi*, growth, Survival

Abstract

In this study, the effect of ethanolic extracts of *Sargassum angustifolium* on growth and survival of shrimp *Litopenaeus vannamei* juvenile was investigated under challenge with shrimp pathogen bacteria *Vibrio harveyi*. Powder form of the extract was bioencapsulated in *Artemia* and fed to *L. vannamei* juvenile reared as 5 groups inclouding C- (unenriched Artemia, without bacteria), C+ (unenriched Artemia, with bacteria), T_1 (enriched Artemia with 200 mg l^{-1} SA extract, with bacteria), T_2 (enriched Artemia with 400 mg l^{-1} SA extract, with bacteria), T_3 (enriched Artemia with 600 mg l^{-1} SA extract, with bacteria). One week after culture all groups except C- were inoculated with *V. harveyi* at the rate of 1.5×10^8 CFU ml^{-1} for 15 minutes then after every water exchange 10 ml of *V. harveyi* at the rate of 1.5×10^7 CFU ml^{-1} was added to aquaria. Shrimps at group C- showed maximum survival (86.6%), specific growth rate (SGR, 11.33%) and less bacterial load ($0.5 \pm 0.03 \times 10^2$ CFU g^{-1} tissue). While (C2) exhibited lowest survival (33.3%), SGR (9.90%) and more bacterial load ($3.4 \pm 0.05 \times 10^5$ CFU g^{-1} tissue) and the difference was significant ($p<0.05$). In treatment groups survival and SGR were significantly ($p<0.05$) more than C+ and less than C-, also bacterial load were less than C+ and more than C-. Among treatment groups T_2 that fed with enriched *artemia* with 400 mg l^{-1} SA extract gave better results than the other treatments.

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1393.23.3.10.0]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103539]