تاثیر محرک ایمنی زایموزان بر رشد و مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia fransiscana*) در برابر عفونت باکتری‌های *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolyitcus* در سیستم آزمایش گنوتوبیوتیک (Gnotobiotic)

مه لقا کرمی شیرازی[۱]، ایمان سوری نژاد[*]، سیاوش سلطانیان[۲]

[*]Sourinejad@hormozgan.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- بخش دامپزشکی، گروه دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

چکیده

یکی از روش‌های جدید پیشگیری و کنترل بیماری‌های آبزیان استفاده از انواع محرک‌های ایمنی در سیستم گنوتوبیوتیک برای درک مکانیسم‌های درگیر در تعاملات میزبان- میکروب می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر محرک ایمنی زایموزان بر رشد و مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia fransiscana*) در برابر عفونت باکتری‌های بیماری‌زای *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolyitcus* در آبزیان در شرایط گنوتوبیوتیک صورت گرفت. ناپلی آرتمیا با باکتری کشته شده *LVS3* حدود $۱۰^{۹}$ × ۱۰/۵ سلول بر لوله فالکون در هر روز غذادهی شد (تیمار شاهد). زایموزان به صورت روزانه به مقدار ۳۰/۶ میکروگرم به هر فالکون در تیمارهای آزمایشی اضافه شد. در روز سوم پاتوژن‌های *V. campbellii* و *V. proteolyitus* در تراکم $۱۰^{۶}$ × ۵ *cell/ml* اضافه گردیدند. در روز ششم زایموزان باعث افزایش معنی‌دار درصد بازماندگی روزانه آرتمیا در برابر *V. campbellii* (۵۴/۴۹±۱/۵۳) نسبت به تیمار شاهد (۳۱/۷۲±۹/۸۷)، درصد نسبی بازماندگی (۸۰±۰/۰۸) نسبت به تیمار شاهد (۴۷±۰/۱۷) و زیست‌توده کل تولید شده برحسب میلی متر در فالکون (۲۱/۱۷±۰/۱۸) نسبت به تیمار شاهد (۹/۰۴±۴/۴۶) گردید ($p<۰/۰۵$). زایموزان اگرچه در برابر *V. proteolyitcus* باعث افزایش درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی و زیست‌توده کل تولید شده نسبت به گروه شاهد شد، اما نتوانست اختلاف معنی داری ایجاد کند ($p>۰/۰۵$). در آرتمیاهای چالش داده شده با *V. campbellii* و *V. proteolyitcus*، طول فردی آرتمیا هرچند تحت تاثیر زایموزان قرار گرفت اما نسبت به تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0.05$). به طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از زایموزان به عنوان محرک ایمنی می‌تواند باعث افزایش مقاومت آرتمیا نسبت به عفونت ویبریو در محیط گنوتوبیوتیک شود.

لغات کلیدی: آرتمیا، سیستم گنوتوبیوتیک، *Vibrio*، زایموزان، بازماندگی

[*]**نویسنده مسئول**

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

مقدمه

آبزی‌پروری صنعتی است که به سرعت در جهان گسترش یافته است. آبزیان معمولاً در فضاهای بسته مانند استخرها، مخازن و قفس‌ها مورد پرورش قرار گرفته‌اند و همواره تلاش می‌شود تا مقدار تولید در واحد حجم یا واحد سطح افزایش یابد. از سویی، افزایش تراکم با ایجاد شرایط تنش بخصوص کاهش اکسیژن، افزایش مواد دفعی و غیره، از نظر فیزیولوژی ماهیان را ضعیف می‌کند و احتمال درگیری آنها را با عوامل بیماری‌زا افزایش خواهد داد که در نهایت منجر به ایجاد شرایط مخاطره آمیز برای سلامت ماهیان خواهد شد (Barman *et al*., 2013).

تاکنون درمان اختصاصی برای تعدادی از بیماری‌های آبزیان مشخص نشده است و نتیجه درمان‌های دارویی در مطالعات تحقیقاتی و شرایط آزمایشگاهی اغلب با نتایج بدست آمده در شرایط طبیعی و عملی حاکم بر کارگاه‌های پرورشی، مطابقت کاملی ندارد یا حتی در مواردی با توجه به نوع تکنولوژیِ پرورش، متفاوت بوده است. در آینده برای کامیابی در صنعت آبزی‌پروری، ضروری است که تلفات ناشی از بیماری‌ها در کمترین مقدار خود نگهداشته شوند (ایمان‌پور و همکاران، ۱۳۹۴؛ شیخ‌اسدی و همکاران، ۱۳۹۷). از حدود دو دهه قبل تجویز داروهای متعددی برای درمان عفونت‌های مختلف ماهیان بویژه عفونت‌های باکتریایی صورت گرفته است که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. با این حال، مواجهه با موضوع مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و توسعه گونه‌های باکتری مقاوم در آینده، نگرانی‌هایی را برای مصرف کنندگان بدنبال داشته است و از سوی دیگر، تجمع و باقیماندن مواد آنتی‌بیوتیک در بدن آبزیان پرورشی و همچنین اثرات آلایندگی این داروها بر محیط زیست، از مهم‌ترین مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها قلمداد می‌شوند (Bachere, 2003).

با توجه به مشکلات بیان شده در درمان و کنترل بیماری‌های آبزیان، امروزه یکی از روش‌های پیشگیری و کنترل این‌گونه بیماری‌ها، استفاده از انواع محرک‌های ایمنی می‌باشد. محرک‌های ایمنی سبب افزایش مقاومت آبزیان در برابر انواع بیماری‌های عفونی از طریق تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌گردند (Marques *et al*., 2006). اغلب محرک‌های ایمنی مورد استفاده در آبزیان فاقد هر گونه اثرات منفی موجود در داروهای ضد باکتریایی و واکسن‌ها بر محیط‌زیست هستند و اکثراً جزء ترکیبات طبیعی محسوب می‌شوند و باقیمانده‌های دارویی نامطلوب ایجاد نمی‌کنند (Dugenci *et al*., 2003). بتاگلوکان‌ها (Sung *et al*., 1996)، کیتین (Vici *et al*., 2000)، مانوپروتئین‌ها (Tizard *et al*., 1989)، پپتیدوگلیکان (Itami *et al*., 1998) و باکتری‌های مرده (Vici *et al*., 2000; Keith *et al*., 1992) از جمله محرک‌های ایمنی در مهره داران و بی‌مهرگان پرورشی هستند که برای القاء و ایجاد حفاظت در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها استفاده می‌شوند.

زایموزان یک ترکیب غیر محلول دیواره سلولی مخمر با ساختاری مرکب از گلوکان در اتصال به پروتئین است که اولین بار این نام به فراکشن مخمری (*Saccharomyces cerevisiae*) داده شد که دارای خواص ایمنولوژیک ویژه ای بود که می‌توانست کمپلمان را غیرفعال نماید. در اواخر دهه ۱۹۸۰ محققین دانشگاه هاروارد نحوه فعالیت بتاگلوکان (ماده موثره زایموزان) در تحریک سیستم ایمنی را توصیف کردند. گیرنده خاصی برای بتاگلوکان در سطح برخی از سلول‌ها نظیر ماکروفاژها وجود دارد که فعال شدن آن آبشاری از وقایع ایمنولوژیک را بدنبال دارد و به افزایش پاسخ ایمنی می‌انجامد (Dalmo and Bogwald, 2008).

Marques و همکاران (۲۰۰۶) اخیراً سیستم گنوتوبیوتیک آرتمیا را توسعه داده و مفید بودن آن را تایید نموده‌اند. این سیستم اجازه می‌دهد اثر ترکیبات مختلف از جمله انواع مواد غذایی (نوترینت‌ها)، مواد محرک ایمنی، پربیوتیک و پروبیوتیک‌ها و غیره در بازماندگی و رشد و عملکرد دستگاه ایمنی در حضور یا عدم حضور پاتوژن مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از سیستم گنوتوبیوتیک [پرورش حیوانات در شرایط axenic (فاقد جرم میکروبی) یا شرایط gnotobiotic (حاوی جرم

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

یا اجرام میکروبی شناخته شده)] می‌تواند ابزاری بسیار عالی برای درک مکانیسم‌های درگیر در تعاملات میزبان- میکروب و چگونگی تاثیر عوامل و ترکیبات افزودنی بر تعامل و هم‌کنشی میزبان- میکروب و در نتیجه ارزیابی روش‌های پیشگیری، کنترلی و درمانی متنوع و جدید در آبزی‌پروری باشد (Soltanian *et al*., 2007). در واقع، این سیستم می‌تواند به عنوان ابزاری منحصربفرد برای تفریق بین اثرات تغذیه‌ای و خواص واقعی تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی ناشی از کاربرد یک محصول خاص استفاده شود.

تاکنون آبزیان مختلفی مانند ماهی، نرم‌تنان، سخت‌پوستان، روتیفرها و خارپوستان در شرایط عاری از میکروب پرورش داده شده‌اند. در بیشتر مطالعاتی که تاکنون بر تعاملات میزبان-میکروب سخت‌پوستان انجام شده، از آرتمیای عاری از میکروب به عنوان یک مدل آزمایشی استفاده شده است (Marques *et al*., 2006; Soltanian *et al*., 2007). آرتمیا بخش مهمی از زنجیره غذایی زنده در پرورش لارو ماهی و صدف است (Triantaphyllidis *et al*., 1998) و همچنین به طور گسترده‌ای در هچری‌ها برای انتقال محرک ایمنی (با استفاده از روش bioencapsulation که به موجب آن ترکیبات خاص در موجودات طعمه زنده گنجانده شده است) مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند طیف گسترده‌ای از ذرات غذا را به عنوان صافی‌خوار غیر انتخاب‌گر گیرد (Sorgeloos *et al*., 2001). با توجه به فقدان گزارش‌های قبلی در زمینه استفاده از محرک ایمنی زایموزان در سیستم گنوتوبیوتیک پرورش آرتمیا در کشور ایران، مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر محرک ایمنی زایموزان بر افزایش مقاومت *Artemia fransiscana* در برابر عفونت باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolyitcus* و همچنین تاثیر این محرک‌های ایمنی بر رشد آرتمیا در شرایط آزمایش گنوتوبیوتیک صورت گرفت.

مواد و روش کار

گونه‌های باکتری و شرایط رشد

در این تحقیق سه گونه باکتری شامل باکتری LVS3 (سویه‌ای از *Aeromonas hydrophyla*)، باکتری LMG21363 (سویه‌ای از *V. campbellii*) و باکتری CW8T2 (سویه‌ای از *V. proteolytiqus*)، مورد استفاده قرار گرفت. *A. hydrophyla* نقش تغذیه کننده آرتمیا را دارد و در غلظت مطلوب تاثیر مثبت بر رشد و بازماندگی آن خواهد داشت. از دو باکتری دیگر که باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان هستند، برای چالش میکروبی آرتمیا استفاده گردید. کشت خالص سویه باکتریایی از آزمایشگاه اکولوژی و فناوری میکروبی و آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه گنت بلژیک تهیه شد. ابتدا کشت خالص باکتری‌ها از دمای ۷۲- درجه سانتی‌گراد برداشته شد و پس از یخ زدایی در دمای اتاق در محیط کشت آگار دریایی[1] در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. برای هر یک از گونه‌های باکتری تنها یک کلونی از پلت‌های کشت، انتخاب شد و سپس در محیط کشت مارین براث ۲۲۱۶ تلقیح شد و روی انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی قرار داده شد. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب حاصل که حاوی باکتری بود در آب نمک (شوری ۳۰ قسمت در هزار) فیلتر و اتوکلاو شد و سوسپانسیون گردید. برای تعیین غلظت باکتری‌ها در سوسپانسیون از اسپکتروفتومتراستفاده گردید. آرتمیا از LVS3 کشته شده (اتوکلاو شده) با استفاده از مقادیر یکسان تغذیه شد (Soltanian *et al*., 2007).

تعیین تراکم باکتری بوسیله اسپکتروفتومتری

پس از کشت باکتری‌ها در محیط کشت مارین براث ۲۲۱۶، برای تعیین تراکم باکتری‌ها، محتویات محیط کشت داخل هر ارلن به صورت جداگانه با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی بیرون ریخته شد و به قسمت زیرین (باکتری‌های ته نشین شده) برای شستشو و جداسازی

[1] Marine agar

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

محیط کشت از باکتری‌ها، آب دریای فیلتر و اتوکلاوشده اضافه گردید و به طور کامل بهم زده شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید. پس از دو بار شستشو با افزودن آب دریای فیلتر و اتوکلاو شده به توده باکتری‌های ته نشین شده و بهم زدن، سوسپانسیون باکتریایی یکنواختی به دست آمد. برای سنجش و تنظیم تراکم باکتری‌ها از اسپکتروفتومتر دیجیتالی استفاده شد. برای تعیین تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر، مقدار یک سی سی از هر فالکون به وسیله سمپلر برداشت شد و در سه لوله آزمایش به طور جداگانه ریخته شد. در صورت نیاز رقیق سازی باکتری‌ها صورت گرفت. ابتدا اسپکتروفتومتر با آب دریای اتوکلاو شده کالیبره گردید و سپس هریک از نمونه‌های باکتری در سه تکرار به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. عدد بدست آمده در رابطه ۱ قرار گرفت که در این رابطه DF میزان رقیق‌سازی و OD عدد خوانده شده توسط اسکپتروفتومتر است (Toi *et al*., 2014).

رابطه ۱:

= مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر آماده‌سازی باکتری‌ها

$DF\times OD\times 1.2\times 10^{9}$

باکتری مورد استفاده در تغذیه آرتمیا (LVS3) قبل از شروع هر دوره در محیط مارین براث، کشت داده شد و سپس سانتریفیوژ گردید و بعد از تعیین OD، اتوکلاو گردید و برای استفاده در یک دوره شش روزه در یخچال نگه‌داری شد. اما باکتری‌های ویبریو در روز دوم آزمایش در محیط مارین براث کشت داده شدند و در روز سوم بعد از تعیین OD برای چالش باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند (Soltanian *et al*., 2007).

کشت گنوتوبیوتیک آرتمیا

آزمایش با سیست *A. fransiscana* انجام شد. قبل از شروع کار همه ابزارهای لازم در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو ضدعفونی شدند و همه دستکاری‌ها زیر هود میکروبیولوژی انجام گردید. تمام باکتری‌های سطحی سیست و ناپلی آرتمیا با استفاده از روش پوسته‌زدایی و تخم‌گشایی زدوده شدند. پس از تخم‌گشایی سیست‌ها، ۲۰ ناپلی در مرحله Instar II به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از آب دریایی فیلتر و اتوکلاو شده با شوری ppt ۳۰ همراه با خوراک برنامه‌ریزی شده بود، منتقل شدند. مقدار کل LVS3 مرده که برای یک دوره تغذیه پنج روزه در اختیار آرتمیا قرار گرفت، در حدود $۱۰^{۹}$ × ۱۰/۵ سلول در هر لوله فالکون بود (Marques *et al*., 2006).

پوسته‌زدایی

پوسته‌زدایی با استفاده از روش Sorgeloos و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. ابتدا یک گرم سیست *A. fransiscana* به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آبدهی و هوادهی شد. سپس محلول پوسته‌زدایی[1] آماده شد، بدین صورت که به ازای یک گرم سیست ۱۴ میلی‌لیتر محلول طبق رابطه ۲ فراهم گردید.

رابطه ۲:

14 CC : 10 CC NaOCl 5% +0 .33 cc NaOH 40% + 3.67 CC water

1 gr cyst + 14 cc decapsulating solution

سیست‌های آبدهی شده به محلول اضافه شدند و هوادهی انجام گردید. بعد از سه دقیقه که رنگ سیست‌ها به نارنجی تغییر کرد، در توری با چشمه ۱۰۰ میکرون ریخته و با آب شستشو داده شدند. برای حذف کلر احتمالی، سیست‌ها با تیوسولفات سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه همراه با هوادهی مخلوط گردیدند و با آب ضد عفونی شده، شستشو داده شدند.

روش مورد استفاده برای تایید axenity

برای اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی در هر آزمایش، غذا، سیست‌های پوسته‌زدایی شده قبل از تخم‌گشایی و همچنین محیط کشت آرتمیای گنوتوبیوتیک در پایان هر دوره آزمایش، بر روی آگار دریایی کشت داده شد یا آلودگی باکتریایی احتمالی آنها بعد از رنگ‌آمیزی با tetrazalium salt MTT کنترل شد. در تمام آزمایش‌ها قبل از چالش میکروبی، آلودگی میکروبی کنترل شد و

[1] Decapsulating solution

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

لوله‌های حاوی کشت آلوده حذف گردید و تیمار دوباره تکرار شد (Marques *et al*., 2006).

آماده سازی زایموزان

برای استفاده از زایموزان از مرجع Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) استفاده گردید. زایموزان از شرکت سیگما خریداری شد و بر اساس روش مرجع، به ازای هر فالکون در هر روز مقدار ۳۰/۶ میکروگرم زایموزان اضافه شد و در شرایط استریل با آب مقطر مخلوط گردید و سپس برای حذف احتمالی میکروارگانیسم‌ها، محلول به مدت پنج دقیقه در حمام آب با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با دستگاه ورتکس سوسپانسیون یکنواختی بدست آمد و به اندازه مقدار مصرف روزانه، در اندازه های مساوی تقسیم شد و برای پیشگیری از آلودگی در حین استفاده، به اپندورف‌های کوچک‌تر انتقال داده شدند.

طراحی آزمایش

دو آزمایش به صورت مجزا برای تایید تکرار پذیر بودن نتایج انجام شد که طراحی این آزمایش ها در جدول ۱ ارائه شده است. این آزمایش‌ها شامل شش تیمار بودند که تیماری که در آن آرتمیا فقط از باکتری کشته شده تغذیه شده بود (ردیف ۱)، به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد (جدول ۱). هر تیمار دارای چهار تکرار بود. در آزمایش‌های ۱ و ۲ ناپلی‌های آرتمیا با LVS3 در حدود $۱۰^{۹} \times ۱۰/۵$ سلول بر لوله فالکون در هر روز غذادهی شدند. همچنین محرک‌های ایمنی به مقدار مورد نیاز به صورت روزانه به فالکون‌ها اضافه شدند. در روز سوم پاتوژن‌های *V. campbellii* (VC) و *V. proteolyitcus* (VP) در تراکم ۵×۱۰^{۶} cell/ml اضافه گردیدند. در تیمار شاهد فقط غذادهی انجام شد و چالش داده شد (Soltanian *et al*., 2007).

بازماندگی و رشد آرتمیا

درصد بازماندگی روزانه (DS)[1] آرتمیا برای هر تیمار محاسبه شد. برای این منظور تعداد آرتمیاهای زنده قبل از تغذیه یا اضافه کردن باکتری بوسیله شمارش با چشم غیر مسلح با قرار دادن هر لوله فالکون در معرض یک لامپ رشته‌ای ثبت شد. در پایان هر آزمایش (۶ روز بعد از خروج از تخم) آرتمیاهای زنده برای اندازه‌گیری طول فردی (IL)[2] با لوگل فیکس شدند و پس از قرار دادن روی لام، توسط لوپ و دستگاه دیجیتایزر اندازه گیری شدند. زیست‌توده کل تولید شده (TBP)[3] که ترکیبی از هر دو پارامتر بازماندگی و طول فردی است با توجه به رابطه ۳ تعیین گردید (Marques *et al*., 2006).

رابطه ۳:

زیست‌توده کل (میلی متر در فالکون) = تعداد آرتمیاهای زنده در روز ششم × میانگین طول انفرادی

روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS16 در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام گردید و تفاوت در درصد بازماندگی روزانه، درصد بازماندگی نسبی (RPS)[4]، طول فردی و زیست‌توده کل تولید شده آرتمیا در شرایط مختلف کشت با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اثر زایموزان بر عملکرد آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده در آزمون چالش با *V. campbellii* و*V. proteolyitcus* در دو آزمایش جداگانه در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است.

درصد بازماندگی روزانه

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolyticus*، در روز چهارم، پنجم و ششم درصد بازماندگی در آرتمیاهایی که با LVS3 کشته شده و زایموزان (تیمار ۵) تغذیه شده بودند نسبت به آرتمیاهایی که فقط با LVS3 کشته شده (تیمار ۲) تغذیه شده بودند بالاتر بود اما اختلاف معنی داری نداشتند (جداول ۲ و ۳). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری‌زا (روز چهارم تا ششم) درصد بازماندگی کاهش یافت.

[1] Daily survival

[2] Individual length (IL)

[3] Total biomass production (TBP)

[4] Relative percentage of survival

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

جدول ۱: طراحی آزمایش های ۱ و ۲ در دوره شش روزه مطالعه حاضر

Table 1: Design of the experiments 1 and 2 in the 6-day period of the present study.

آزمایش‌های ۱ و ۲	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم
تیمار یک (شاهد)	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار دو	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده+ VP	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار سه	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده+ VC	باکتری کشته شده	باکتری کشته شده	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار چهار	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار پنج	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+زایموزان+VP	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار شش	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموران+ VC	باکتری کشته شده+ زایموزان	باکتری کشته شده+ زایموزان	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده

VC: *V. Campbellii*; VP: *V. proteolyitcus*

جدول ۲: آزمایش ۱: درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی و زیست‌توده کل تولید شده آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده یا به همراه زایموزان بعد از شش روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* (VC) و *V. proteolyitcus* (VP) چالش داده شده است.

Table 2: Experiment 1: Daily survival, relative percentage of survival, mean of individual length and total biomass production of artemia fed with LVS3 or with zymosan after 6 days which have been challenged with VC or VP in the third day.

تیمار	درصدبازماندگی روزانه			درصدنسبی بازماندگی	طول فردی (میلی‌متر)	زیست‌توده کل تولید شده (میلی متر در فالکون)
	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۷۲/۹۴±۲/۵۷^{bc}	۷۰/۴۷±۲/۱۷^{bc}	۶۷/۵۸±۵/۴۵^{b}	-	۱/۷۸±۰/۰۶^{c}	۳۰/۲۶±۲/۸۵^{b}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۶۹/۵۳±۴/۰۶^{abc}	۶۲/۹۴±۶/۳۵^{bc}	۶۲/۰۸±۶/۴۹^{b}	۹۲±۰/۰۱^{b}	۱/۷۲±+۰/۰۳^{bc}	۲۶/۶۶±۳/۰۲^{b}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۵۴/۷۲±۸/۵۳^{a}	۳۶/۹۲±۹/۸۷^{a}	۳۱/۷۲±۹/۸۷^{a}	۴۷±۰/۱۷^{a}	۱/۵۸±۰/۰۳^{a}	۹/۰۴±۴/۴۶^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان	۸۶/۷۶±۶/۴۶^{c}	۸۰/۱۲±+۱/۲۶^{c}	۶۶/۹۳±۷/۳۷^{b}	-	۱/۷۱±۰/۰۶^{abc}	۲۸/۷۱±۳/۸۵^{b}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان و چالش داده شده با VP	۸۰/۱۲±۱/۰۸ ^{bc}	۶۸/۷۳±۱/۸۵^{bc}	۶۶/۶۴±۱/۸۹^{b}	۹۸±۰/۲۷^{b}	۱/۶۷±+۰/۰۵^{abc}	۲۶/۴۵±۷/۷۷^{b}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان و چالش داده شده با VC	۶۷/۲۱±۸/۹۲^{ab}	۵۵/۲۵±۱/۷۶^{ab}	۵۴/۴۹±۱/۵۳^{b}	۸۰±۰/۰۸^{b}	۱/۶۰±۰/۰۹^{ab}	۲۱/۱۷±۰/۸۱^{b}

* حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانه تفاوت معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

جدول ۳. آزمایش ۲: درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی و زیست‌توده کل تولید شده آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده و یا به همراه زایموزان بعد از شش روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* (VC) و *V. proteolyticus* (VP) چالش داده شده است.

Table 3. Experiment 2: Daily survival, relative percentage of survival, mean of individual length and total biomass production of artemia fed with LVS3 or with zymosan after 6 days which have been challenged with VC or VP in the third day.

تیمار	درصد بازماندگی روزانه (٪)			درصد نسبی بازماندگی	طول فردی (میلی‌متر)	زیست‌توده کل تولیدی (میلی متر در فالکون)
	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۷۸/۴۶±۱/۵۶^{a}	۷۵/۲۳±۱/۳۷^{b}	۷۵/۲۳±۱/۳۷^{c}		۱/۶۰±۰/۰۶^{a}	۲۸/۷۸±۴/۱۳^{c}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۷۳/۶۶±۶/۸۲^{a}	۶۱/۷۷±۳/۳۲^{ab}	۵۶/۲۵±۶/۸۸^{ab}	۷۵±۰/۰۶^{b}	۱/۵۲±+۰/۰۷^{a}	۲۱/۰۷±۴/۱۳^{b}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۶۴/۶۹±۵/۷۰^{a}	۴۷/۰۰±۱/۴۲^{a}	۳۸/۷۲±۱۱/۱۲^{a}	۵۰±۰/۰۷^{a}	۱/۴۷±۰/۱۰^{a}	۱۱/۶۹±۵/۱۶^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان	۷۴/۳۲±۳/۱۸^{a}	۷۲/۹۴±+۲/۷۵^{b}	۷۱/۸۵±۴/۰۴^{bc}		۱/۵۶±۰/۰۱^{a}	۲۸/۱۲±۱/۴۲^{bc}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان و چالش داده شده با VP	۷۷/۵۵±۸/۶۹^{a}	۶۹/۸۲±۵/۸۶^{b}	۶۴/۶۰±۴/۹۱^{bc}	۸۹±۰/۰۴^{b}	۱/۵۵±+۰/۰۵^{a}	۲۵/۱۸±۲/۰۸^{bc}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان و چالش داده شده با VC	۶۴/۴۶±۳/۴۶^{a}	۶۳/۵۲±۲/۹۴^{ab}	۵۹/۲۵±۳/۱۷^{bc}	۸۲±۰/۰۴^{bc}	۱/۵۷±۰/۰۱^{a}	۲۳/۲۲±۱/۴۳^{bc}

* حروف لاتین غیر مشترک در هر ستون نشانه تفاوت معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، درصد بازماندگی در روز چهارم و پنجم در تیمار زایموزان (تیمار ۶) نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۳) بالاتر بود اما اختلاف معنی‌داری نداشتند (جداول ۲ و ۳). درصد بازماندگی در روز ششم در تیمار زایموزان به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری‌زا (روز چهارم الی ششم) درصد بازماندگی کاهش یافت.

درصد نسبی بازماندگی در روز ششم

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolyticus*، درصد نسبی بازماندگی در تیمار زایموزان (تیمار ۵) نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۲) بالاتر بود اما اختلاف معنی‌داری نداشتند (جداول ۲ و ۳). در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، درصد نسبی بازماندگی در تیمار زایموزان (تیمار ۶) نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۳) با اختلاف معنی داری بالاتر بود ($p<۰/۰۵$) (جداول ۲ و ۳). درصد نسبی بازماندگی در تیمار فقط تغذیه شده با LVS3 بین آرتمیا های چالش داده شده با *V. proteolyticus* و *V. campbellii* (تیمار ۲ و ۳) تفاوت معنی‌دار ایجاد کرد و درصد نسبی بازماندگی در آرتمیاهای چالش داده شده با *V. campbellii* پایین‌تر بود ($p<۰/۰۵$) اما درصد نسبی بازماندگی در تیمار زایموزان بین آرتمیاهای چالش داده شده با *V. proteolyticus* و *V. campbellii* (تیمار ۵ و ۶) تفاوت معنی داری نداشت ($p>۰/۰۵$) (جداول ۱ و ۲).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

طول فردی آرتمیا در پایان دوره آزمایش (روز ششم)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolyticus*، طول فردی آرتمیا در تیمار ۲ که از زایموزان تغذیه نشده بود نسبت به تیمار ۵ که از زایموزان تغذیه شده بود، تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii* نیز طول فردی آرتمیا در تیمار ۳ که از زایموزان تغذیه نشده بود، نسبت به تیمار ۶ که از زایموزان تغذیه شده بود، تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$) (جداول ۲ و ۳).

زیست‌توده کل تولید شده (میلی‌متر بر فالکون)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolyticus*، زیست-توده کل تولید شده در تیمار ۲ که از زایموزان تغذیه نشده بود و تیمار ۵ که از زایموزان تغذیه شده بود، تقریباً مساوی بود و اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد. در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، زیست‌توده کل تولید شده در تیمار تغذیه شده با زایموزان (تیمار ۶) نسبت به تیماری که از زایموزان تغذیه نشده بود (تیمار ۳)، بالاتر بود و اختلاف معنی‌داری ایجاد نمود ($p<۰/۰۵$) (جداول ۲ و ۳).

بحث

نتایج کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که زایموزان سبب افزایش عملکرد آرتمیا (درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی و همچنین زیست‌توده کل تولید شده) در برابر پاتوژن های *V. campbellii* و *V. proteolyticus* می‌شود. زایموزان مورد استفاده در این آزمایش یکی از انواع بتاگلوکان‌های تجاری است که از دیواره سلولی مخمر خام *S. cerevisiae* تهیه شده است و حاوی مخلوط نسبتاً خام از پروتئین ها، لیپیدها و پلی ساکاریدهاست که قادر به تحریک ایمنی غیراختصاصی می‌باشد (Freimund *et al*., 2003). بتاگلوکان‌ها پلی‌ساکاریدهای تشکیل یافته از مولکول‌های گلوکز هستند که توسط باندهای β-1,3 و β-1,6 معمولاً در دیواره سلولی مخمرها، باکتری‌ها، جلبک ها، قارچ‌ها و گیاهان یافت می‌شوند (Ai *et al*., 2007). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که گیرنده‌های گلوکان بر ماکروفاژها قرار دارند و قادرند از طریق فعال‌سازی مستقیم ماکروفاژها سبب ارتقاء ایمنی غیراختصاصی شوند (Dalmo and Bogwald, 2008). بتاگلوکان سبب افزایش فعالیت پروتئین‌های ضدمیکروبی نظیر لیزوزیم و کمپلمان، تحریک فعالیت‌های بیگانه‌خواری سلول‌های بیگانه خوار نظیر ماکروفاژها، تولید آنتی‌بادی توسط سلول های لنفوسیت B و همچنین تحریک فرآیندهای فعال‌سازی لنفوسیت‌ها می‌شود که در نتیجه باعث افزایش سطح ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی بدن، افزیش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و کاهش مرگ و میر در آبزیان می‌گردد (Here *et al*., 2004).

نتایج نشان می‌دهد که زایموزان سبب افزایش عملکرد آرتمیا در برابر پاتوژن های *V. campbellii* و *V. proteolyticus* می‌شود. Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) پتانسیل محافظتی مجموعه‌ای از محرک‌های ایمنی شامل شش نوع بتاگلوکان تجاری (که به جز لامینارین همگی از مخمر نانوایی *S. cerevisiae* استخراج شده بودند) و ذرات کیتین را در چالش ناپلی آرتمیا با پاتوژن *V. campbellii* تحت شرایط گنوتوبیوتیک بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بتاگلوکان باعث افزایش بازماندگی قابل توجهی در آرتمیا می‌شود. در مطالعه حاضر برای اولین بار در داخل کشور نیز از همین روش استفاده گردید، با این تفاوت که دوز مصرفی آرتمیا افزایش داده شد و مقدار ۳۰/۶ میکروگرم بر فالکون در هر روز استفاده گردید. همچنین پتانسیل محافظتی آرتمیا در مقابل دو باکتری بیماری‌زای آبزیان (*V. campbellii* و *V. proteolyitcus*) بررسی شد. در مطالعه حاضر و مطالعه انجام شده توسط Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت معنی‌داری در بازماندگی آرتمیا تا روز سوم (قبل از چالش) مشاهده نشد و نتایج نشان داد که برخی از ناپلی‌های چالش داده شده که فقط از LVS3 تغذیه کرده بودند (تیمار شاهد)، توانستند تا روز ششم زنده بمانند اما به طور کلی، عملکرد پایینی (بازماندگی پایین، درصد نسبی بازماندگی پایین و زیست‌توده کل تولید شده کمی) نشان دادند. علاوه بر این، برخی از این

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

بتاگلوکان‌ها (همچون زایموزان، بتاگلوکان خالص شرکت سیگما و بتاگلوکان MacroGrad) توانستند به میزان قابل توجهی تولید زیست‌توده کل را در ناپلی چالش داده شده (در مقایسه با ناپلی‌های چالش داده شده‌ای که این محصولات را دریافت نمی‌کردند)، بهبود دهند که دلیل اصلی آن افزایش درصد بازماندگی آرتمیا بود (Soltanian *et al.*, 2007). به همین دلیل در تحقیق حاضر نیز زایموزان به میزان قابل توجهی تولید زیست‌توده کل را افزایش داد. اما در مطالعه قبلی (Soltanian *et al.*, 2007) هیچ اثر تغذیه‌ای ماکروسکوپی متفاوت (برای مثال، افزایش طول) در میان محصولات مشاهده نشد. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داد که باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolyticus* حتی در حضور عامل محافظت کننده مثل زایموزان تاثیر مثبت معنی‌داری بر رشد طولی آرتمیا ندارند که احتمال می رود این عدم تاثیر مثبت به علت کاهش میزان ضریب تبدیل غذا و ضریب جذب غذا باشد.

Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) اثرات محافظتی مقابل *V. campbellii* را در ناپلی آرتمیا بوسیله تغذیه از بتاگلوکان خالص یا تغذیه از بتاگلوکان سلول‌های مخمر ایزوژنیک و کیتین آنها در شرایط گنوتوبیوتیک بیان نمودند. نتایج نشان داد که خوراندن مقدار کمی از مخمر نانوایی سویه mnn۹ یا ذرات گلوکان می‌تواند از ناپلی آرتمیا در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای *V. campbellii* در شرایط گنوتوبیوتیک محافظت کند. ب‌نظر می‌رسد که مقدار بالاتر یا در دسترس بودن بیشتر بتاگلوکان در مخمر mnn۹ ممکن است نقش اساسی در این محافظت داشته باشد. در مطالعه حاضر نیز که زایموزان بهترین عملکرد (افزایش معنی‌دار درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی و همچنین زیست‌توده کل تولید شده) را داشته است، می‌تواند به دلیل در دسترس بودن زایموزان باشد. چون زایموزان به صورت سوسپانسیون در آب مورد استفاده قرار گرفت.

Marques و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که استفاده از مقدار کمی از تیپ‌های مختلف، اما ایزوژنیک مخمر نانوایی *S. cerevisiae* و ذرات گلوکان بدست آمده از این مخمر در شرایط گنوتوبیوتیک، برای غلبه بر بیماری‌زایی باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolyticus* کافی بوده است. این مطالعه نشان داد که غلظت‌های بالاتر یا در دسترس بودن میزان بیشتری از بتاگلوکان در تیپ‌های مختلف ایزوژنیک مخمر نانوایی *S. cerevisiae* ممکن است نقش اساسی در چنین حفاظتی بازی کند که احتمالاً گلوکان پاسخ ایمنی ناپلی را تقویت می‌کند.

در مطالعه حاضر همانطوریکه از نتایج مشخص گردید، زایموزان آرتمیا را به طور کامل در برابر *V. campbellii* محافظت نمود. اما زایموزان در مورد چالش با *V. proteolyticus* اگرچه عملکرد بهتری (افزایش درصد بازماندگی روزانه و درصد نسبی بازماندگی بالاتر و همچنین زیست‌توده کل تولید شده بیشتر) نسبت به تیمار شاهد داشت، اما در کل تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و گروهی که به آنها محرک‌های ایمنی داده شده بود، ایجاد نکرد و نتوانست آرتمیا را در برابر *V. proteolyticus* به طور کامل محافظت کند و آرتمیا را نسبت به گروه شاهد مقاوم‌تر کند. همچنین در مطالعه حاضر، زمانی که از زایموزان استفاده شد، افزایش مقاومت قابل توجه در برابر *V. campbellii* از نظر شاخص RPS بدست آمد که مطابق با نتایج بتاگلوکان مورد استفاده توسط Marques و همکاران (۲۰۰۶) و Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) است. در واقع، می‌توان احتمال داد که تاثیر مثبت زایموزان بر بازماندگی به علت مقدار بالای بتاگلوکان است که در اختیار آرتمیا قرار می گیرد، هرچند مشخص گردیده است که تنها داشتن مقدار زیادی از بتاگلوکان به تنهایی برای حفاظت از آرتمیا کافی نیست (Soltanian *et al.*, 2007). بنابراین، می‌توان احتمال داد که پتانسیل حفاظتی بوجود آمده در برابر *V. campbellii* فقط به مقدار بتاگلوکان وابسته نیست بلکه کیفیت بتاگلوکان از نظر وزن مولکولی، ساختار سه بعدی و نوع شاخه‌ها نیز می‌تواند مهم باشد (Chang *et al.*, 2003).

در crayfish (*Procambarus clarkii*) زایموزان توانست سیستم prophenoloxidase (ProPO) را فعال کند. این سیستم نقش اساسی در فعال شدن دفاع غیراختصاصی در بندپایان دارد (Cardenas and

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

Dankert, 1997). Sung و همکاران (۱۹۹۶) از زایموزان در درمان میکروبی میگو به روش غوطه‌وری استفاده کردند. نتایج نشان‌داد که زایموزان به طور قابل توجهی سبب افزایش فعالیت آنتی بادی anti-*E. coli* در پلاسما می‌شود. همچنین این محرک ایمنی باعث افزایش فعالیت سیستم آنیون سوپر اکساید (o^2) و فعالیت prophenoloxidase (ProPO) در هموسیت میگو می‌گردد. این واکنش ضد میکروبی سبب افزایش توانایی همولنف در برابر پاتوژن ویبریو نیز شده است (Sung *et al*., 1994). هر چند در مورد آرتمیا روشن نیست، اما Chang و همکاران (۱۹۹۹) نشان‌دادند که وقتی بتاگلوکان به سایر سخت‌پوستان مانند میگو ارائه می‌گردد، سبب فعال شدن هموسیت می‌شود که نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن سخت پوستان دارد. هنگامی که بتاگلوکان وجود داشته باشد، هموسیت برای از بین بردن عوامل بیماری‌زا از طریق فاگوسیتوز یا انتشار مولکول‌های بیواکتیو قوی و پپتیدهای ضدمیکروبی که به فاگوسیتوز کمک می‌کنند، فعال می‌شود (Chang *et al*., 1999).

در جمع بندی، بررسی و مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که زایموزان در هر دو مطالعه توانسته است آرتمیا را در مقابل *V. campbellii* محافظت کند، اگرچه درصد بازماندگی روزانه و درصد نسبی بازماندگی در پژوهش Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) بالاتر بوده است که می‌تواند به علت دوز مورد استفاده بهینه باشد. همچنین زیست‌توده کل در مطالعه حاضر بالاتر بود که به دلیل افزایش طول فردی آرتمیا می‌باشد. از *V. proteolyticus* به عنوان باکتری بیماری زا استفاده شد و زایموزان توانست عملکرد آرتمیا را در برابر این باکتری بهبود ببخشد.

در نتیجه‌گیری کلی، می‌توان بیان نمود که در سیستم گنوتوبیوتیکِ مطالعه حاضر، در تیمارهای حاوی زایموزان نسبت به تیمار شاهد، بازماندگی و رشد بیشتری مشاهده شد و زایموزان توانست تاثیر بهینه بر مقاومت آرتمیا در برابر *V. campbellii* و *V. proteolyticus* نشان دهد. این اولین بار است که زایموزان به عنوان محرک ایمنی در یک تست چالش استاندارد در ایران در شرایط گنوتوبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفته است و می‌توان با مطالعات تکمیلی، به دوز بهینه برای تاثیر بیشتر در مقابل باکتری‌های مهم بیماری‌زا رسید. با استفاده از این سیستم گنوتوبیوتیک و تکمیل آن با اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی و تجزیه و تحلیل بیان ژن می‌توان اسناد بیشتری در مورد تاثیر دقیق زایموزان بر فاکتورهای ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در آرتمیا به عنوان مدلی از سخت‌پوستان ارائه داد و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در این فرآیندها را شناسایی نمود.

منابع

ایمان‌پور، م.ر.، سلاقی، ز.، روحی، ز.، بیک‌زاده، آ. و داودی‌پور، ع.، ۱۳۹۴. اثر مکمل گیاهی سنگروویت بر رشد، پارامترهای بیوشیمیایی خون، بازماندگی و مقاومت در برابر تنش شوری بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۴ (۳): ۱۳-۲۲. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110190

شیخ‌اسدی، م.، ذریه زهرا، س.ج.، رفیعی پور، ا.، یزدان پناه، ل. و سیرپور، ق. ۱۳۹۷. تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل پودر زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بر شاخص های رشد، بازماندگی و ترکیبات شیمیایی لاشه میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷ (۳): ۱۲۱-۱۳۰. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117059

Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H., 2007. Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(4): 394-402. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.06.011.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

Bachere, E., 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 227(1-4): 427-438. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00521-0.

Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C. and Kumar, V., 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Marine Science: Research and Development*, 3: 134. DOI: 10.4172/2155-9910.1000134.

Cardenas, W. and Dankert, J.R., 1997. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(5): 283-295. DOI: 10.1006/fsim.1997.0083.

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C., 2003. Dietary b-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 15(4): 297-310.

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, C.F., Kou, G.H. and Liao, I.C., 1999. Effect of dietary β-1, 3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(3): 163-168. DOI: 10.3354/dao036163.

Dalmo, R.A. and Bøgwald, J., 2008. ß-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and shellfish Immunology*, 25(4): 384-396. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.04.008.

Dugenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1): 99-106. DOI: 10.1016/S0378-8741(03)00182-X.

Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O. and Duller, H., 2003. A new non-degrading isolation process for 1, 3-b-glucan of high purity from bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2): 159-171. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00162-0.

Here, J., Gordon, S. and Brown, G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of β-glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, 40(12): 869-876.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from Bifidobacterium thermophilum. *Aquaculture*, 164(1-4): 277-288. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00193-8.

Keith, I.R., Paterson, W.D., Airdrie, D. and Boston, L.D., 1992. Defense mechanisms of the American lobster (*Homarus americanus*): vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. *Fish and Shellfish Immunology*, 2(2): 109-119. DOI: 10.1016/S1050-4648(05)80040-3.

Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2006. Immunostimulatory nature of b-glucans and bakers yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

and Shellfish Immunology, 20(5): 682-692. DOI: 10.1016/j.fsi.2005.08.008.

Soltanian, S., François, J.M., Dhont, J., Arnouts, S., Sorgeloos, P. And Bossier, P., 2007. Enhanced disease resistance in Artemia by application of commercial beta-glucans sources and chitin in a gnotobiotic Artemia challenge test. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6): 1304-1314.

Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1-2): 147-159. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00698-6.

Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, Y.L., 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (Penaeus monodon). *Fish Pathology*, 29(1): 11-17. DOI: 10.3147/jsfp.29.11.

Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L., 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology*, 16(2): 278-284. DOI: 10.1163/193724096X00063.

Tizard, I.R., Carpenter, R.H., McAnalley, B.H. and Kemp, M.C., 1989. The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Molecular Biotherapy*, 1(6): 290-296.

Toi, H.T., Boeckx, P., Sorgeloos, P., Bossier, P. and Van Stappen, G. 2014. Co-feeding of microalgae Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2527-2533.

Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T. and Sorgeloos, P., 1998. Review of the biogeography of the genus Artemia (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*, 25(2): 213-226. DOI: 10.1046/j.1365-2699.1998.252190.x.

Vici, V., Singh, I.B. and Bhat, S.G., 2000. Application of bacterins and yeast Acremonium dyosporiito protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(6): 559-563. DOI: 10.1006/fsim.2000.0278.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]

The effect of zymosan immunostimulant on artemia growth and resistance to vibrio infection in a gnotobiotic artemia test system

Karami Shirazi M.[1]; Sourinejad I.[1*]; Soltanian S.[2]

[*]sourinejad@hormozgan.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas

2-Aquatic Animal Health and Diseases Department, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz

Abstract

One of the most useful methods of increasing resistance through impact on the aquatic immune system is trying to boost the immune system through various ways such as vaccination and the use of immune enhancers such as immune stimulants, probiotics and glucan compounds etc. Modern fish farming systems are common. The use of immunostimulants in gnotobiotic system is one of the new methods to prevent and control the aquatic diseases by realizing the mechanisms involved in host-microbe interactions. This study was designed to investigate the effect of zymosan immunostimulant on *Artemia fransiscana* growth and resistance to *Vibrio campbellii* and *Vibrio proteolyticus* infections in a gnotobiotic system. Artemia nauplii were fed with killed LVS3, about 10.5×109 cells per falcon tube per day (control). Zymosan was added in an amount of 30.6 mcg per falcon tube daily in experimental treatments. On the third day, *V. campbellii* and *V. proteolyitus* pathogens were added at 5 $\times 10^{6}$ cell /ml. On the sixth day of the experiment, zymosan increased the percentage of daily survival against *V. campbellii* (54.49±1.53) compared with control (31.72±9.87), relative percentage of survival (80±0.08) compared with control (47±0.17) and total biomass production (21.17±0.18) compared with control (9.04±4.46) ($p<0.05$). Although zymosan increased the percentage of daily survival, the relative percentage of survival and total biomass production against *V. proteolyticus* compared with the control, but the differences were not significant ($p>0.05$). Zymosan also had positive impact on the individual length of challenged artemia with *V. campbellii* and *V. proteolyticus*, however that was not significant compared with the control ($p>0.05$). In conclusion, the results revealed that the zymosan as an immunostimulant could increase the artemia resistance against vibrio infections in gnotobiotic environment.

Keywords: Artemia, Gnotobiotic system, *Vibrio*, Zymosan, Survival

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-23]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.1.7.5]