

تأثیر محرک ایمنی زایموزان بر رشد و مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia*) در برابر عفونت باکتری‌های *Vibrio campbellii* و *Vibrio* *proteolyticus* 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 پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: اردیبهشت 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 تأثیر محرک ایمنی زایموزان بر رشد و مقاومت آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) در برابر عفونت باکتری‌های بیماری‌زای *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolyticus* در آبزیان در شرایط گنوتوبیوتیک صورت گرفت. ناپلی آرتمیا با باکتری کشته شده LVS3 حدود $10^1 \times 10/5$ سلول بر لوله فالكون در هر روز غذاهای (تیمار شاهد). زایموزان به صورت روزانه به مقدار $30/6$ میکروگرم به هر فالكون در تیمارهای آزمایشی اضافه شد. در روز سوم پاتوژن‌های *V. campbellii* و *V. proteolyticus* در تراکم $10^6 \text{ cell/ml} \times 5$ اضافه گردیدند. در روز ششم زایموزان باعث افزایش معنی‌دار درصد بازماندگی روزانه آرتمیا در برابر *V. campbellii* ($54/49 \pm 1/53$) نسبت به تیمار شاهد ($31/72 \pm 9/87$)، درصد نسبی بازماندگی ($80 \pm 0/08$) نسبت به تیمار شاهد ($47 \pm 0/17$) و زیست‌توده کل تولید شده برحسب میلی‌متر در فالكون ($21/17 \pm 0/18$) نسبت به تیمار شاهد ($9/04 \pm 4/46$) گردید ($p < 0/05$). زایموزان اگرچه در برابر *V. proteolyticus* باعث افزایش درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی و زیست‌توده کل تولید شده نسبت به گروه شاهد شد، اما نتوانست اختلاف معنی‌داری ایجاد کند ($p > 0/05$). در آرتمیاهای چالش داده شده با *V. campbellii* و *V. proteolyticus*، طول فردی آرتمیا هرچند تحت تأثیر 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 و بی‌ریو در محیط گنوتوبیوتیک شود.

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

*نویسنده مسئول

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 تکنولوژی 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 آلاینده‌گی 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 آشناری 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

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. proteolyticus*)، 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^۱ 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 برات ۲۲۱۶ تلقیح شد و روی انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد 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 اسپکتروفتومتر استفاده 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 برات 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

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 آبی‌پروری 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 هجری‌ها 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. proteolyticus* و همچنین تاثیر این محرک‌های ایمنی بر رشد آرتمیا در شرایط آزمایش گنوتوبیوتیک صورت گرفت.

^۱ Marine agar

تخم‌گشایی سیستم‌ها، ۲۰ ناپلی در مرحله Instar II به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از آب دریایی فیلتر و اتوکلاو شده با شوری ۳۰ ppt همراه با خوراک برنامه‌ریزی شده بود، منتقل شدند. مقدار کل LVS3 مرده که برای یک دوره تغذیه پنج روزه در اختیار آرتمی قرار گرفت، در حدود $10^9 \times 10/5$ سلول در هر لوله فالکون بود (Marques et al., 2006).

پوسته‌زدایی

پوسته‌زدایی با استفاده از روش Sorgheloos و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. ابتدا یک گرم سیست A. *fransiscana* به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آبدی و هوادهی شد. سپس محلول پوسته‌زدایی^۱ 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 آبدی 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

محیط کشت از باکتری‌ها، آب دریایی فیلتر و اتوکلاو شده اضافه گردید و به طور کامل بهم زده شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید. پس از دو بار شستشو با افزودن آب دریایی 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 دریایی 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 اسپکتروفتومتر 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 آرتمی (LVS3) قبل از شروع هر دوره در محیط مارین برات، 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 برات کشت داده شدند و در روز سوم بعد از تعیین OD برای چالش باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند (Soltanian et al., 2007).

کشت گنوتوبیوتیک آرتمی

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 ضد عفونی شدند و همه دستکاری‌ها زیر هود میکروبیولوژی انجام گردید. تمام باکتری‌های سطحی سیست و ناپلی آرتمی با استفاده از روش پوسته‌زدایی و تخم‌گشایی زدوده شدند. پس از

لامپ رشته‌ای ثبت شد. در پایان هر آزمایش (۶ روز بعد از خروج از تخم) آرتمیهای زنده برای اندازه‌گیری طول فردی (IL)^۲ با لوگل فیکس شدند و پس از قرار دادن روی لام، توسط لوپ و دستگاه دیجیتالیزر اندازه‌گیری شدند. زیست‌توده کل تولید شده (TBP)^۳ 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 آرتمیهای 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)^۴، 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. proteolyticus* و *campbellii* 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 آرتمیهای که با LVS3 کشته شده و زایموزان (تیمار ۵) تغذیه شده بودند نسبت به آرتمیهای که فقط با LVS3 کشته شده (تیمار ۲) تغذیه شده بودند بالاتر بود اما اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۲ و ۳). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری‌زا (روز چهارم تا ششم) درصد بازماندگی کاهش یافت.

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 میکروارگانیزم‌ها، 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 اندازه‌های 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 آزمایش‌ها 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 $10^9 \times 10/5$ 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. proteolyticus* (VP) در تراکم 5×10^6 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)^۱ آرتمیا برای هر تیمار محاسبه شد. برای این منظور تعداد آرتمیهای زنده قبل از تغذیه یا اضافه کردن باکتری بوسیله شمارش با چشم غیر مسلح با قرار دادن هر لوله فالکون در معرض یک

^۲ Individual length (IL)

^۳ Total biomass production (TBP)

^۴ Relative percentage of survival

^۱ Daily survival

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.

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

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

جدول ۲: آزمایش ۱: درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی و زیست توده کل تولید شده آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده یا به همراه زایموزان بعد از شش روز که در روز سوم با باکتری های *V. campbellii* (VC) و *V. proteolyticus* (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	درصد بازماندگی روزانه			درصد نسبی بازماندگی	طول فردی (میلی متر)	زیست توده کل تولید شده (میلی متر در فاکون)
	روز ششم	روز پنجم	روز چهارم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۶۷/۵۸±۵/۴۵ ^b	۷۰/۴۷±۲/۱۷ ^{bc}	۷۲/۹۴±۲/۵۷ ^{bc}	-	۱/۷۸±۰/۰۶ ^c	۳۰/۲۶±۲/۸۵ ^b
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۶۲/۰۸±۶/۴۹ ^b	۶۲/۹۴±۶/۳۵ ^{bc}	۶۹/۵۳±۴/۰۶ ^{abc}	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	۳۱/۷۲±۹/۸۷ ^a	۳۶/۹۲±۹/۸۷ ^a	۵۴/۷۲±۸/۵۳ ^a	۴۷±۰/۱۷ ^a	۱/۵۸±۰/۰۳ ^a	۹/۰۴±۴/۴۶ ^a
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان	۶۶/۹۳±۷/۳۷ ^b	۸۰/۱۲±۱/۲۶ ^c	۸۶/۷۶±۶/۴۶ ^c	-	۱/۷۱±۰/۰۶ ^{abc}	۲۸/۷۱±۳/۸۵ ^b
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و زایموزان و چالش داده شده با VP	۶۶/۶۴±۱/۸۹ ^b	۶۸/۷۳±۱/۸۵ ^{bc}	۸۰/۱۲±۱/۰۸ ^{bc}	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	۵۴/۴۹±۱/۵۳ ^b	۵۵/۲۵±۱/۷۶ ^{ab}	۶۷/۲۱±۸/۹۲ ^{ab}	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).

جدول ۳. آزمایش ۲: درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی و زیست توده 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 (میلی متر)	زیست توده کل تولیدی (میلی متر در فالكون)
	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	۷۵±۰/۰۶ ^a	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}	۷۵±۰/۰۶ ^b	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 ($p < 0.05$).

نداشتند (جدول 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 ($p < 0.05$) (جدول ۲ و ۳). درصد نسبی بازماندگی در تیمار فقط تغذیه شده با LVS3 بین آرتمیای های چالش داده شده با *V. proteolyticus* و *V. campbellii* (تیمار ۲ و ۳) تفاوت معنی دار ایجاد کرد و درصد نسبی بازماندگی در تیمارهای چالش داده شده با *V. campbellii* پایین تر بود ($p < 0.05$) اما درصد نسبی بازماندگی در تیمار زایموزان بین آرتمیای های چالش داده شده با *V. campbellii* و *V. proteolyticus* (تیمار ۵ و ۶) تفاوت معنی داری نداشت ($p > 0.05$) (جدول ۱ و ۲).

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 معنی داری نداشتند (جدول ۲ و ۳). درصد بازماندگی در روز ششم در تیمار زایموزان به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($p < 0.05$). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری زا (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 معنی داری

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 ضد میکروبی نظیر لیزوزیم و کمپلمان، تحریک فعالیت‌های بیگانه‌خواری سلول‌های بیگانه خوار نظیر ماکروفاژها، تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های لنفوسیت B و همچنین تحریک فرآیندهای فعال‌سازی لنفوسیت‌ها می‌شود که در نتیجه باعث افزایش سطح ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی بدن، افزایش 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 پاتوژن‌های *V. proteolyticus* و *V. campbellii* می‌شود. Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) پتانسیل محافظتی مجموعه‌ای از محرک‌های ایمنی شامل شش نوع بتاگلوکان تجاری (که به جز لامینارین همگی از مخمر نانوائی *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. proteolyticus* و *V. campbellii*) 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

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 ($p > 0.05$) (جدول ۲ و ۳).

زیست‌توده کل تولید شده (میلی‌متر بر فالکون)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolyticus*، زیست‌توده 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 ($p < 0.05$) (جدول 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 پاتوژن‌های *V. proteolyticus* و *V. campbellii* 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 پروتئین‌ها، لیپیدها و پلی‌ساکاریدهاست 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، جلبک‌ها، قارچ‌ها و گیاهان یافت می‌شوند (Ai et al., 2007).

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

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 محافظت‌کننده مثل زایموزان تاثیر مثبت معنی‌داری بر رشد طولی آرتمیا ندارند که احتمال می‌رود این عدم تاثیر مثبت به علت کاهش میزان ضریب تبدیل غذا و ضریب جذب غذا باشد.

Soltanian و همکاران (۲۰۰۷) اثرات حفاظتی 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 نانوائی 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 نانوائی *S. cerevisiae* و ذرات گلوکان بدست آمده از این مخمر

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 کیور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۴ (۳): ۲۲-۳۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110190
- شیخ‌اسدی، م.، ذریه زهرا، س.ج.، رفیعی‌پور، ا.، یزدان پناه، ل. و سیرپور، ق. ۱۳۹۷. تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل پودر زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بر شاخص‌های 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.

(Dankert, 1997). Sung و همکاران (۱۹۹۶) از زایموزان در درمان میکروبی میگو به روش غوطه‌وری استفاده کردند. نتایج نشان داد 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) نشان دادند که وقتی بتاگلوکان به سایر سخت‌پوستان مانند میگو ارائه می‌گردد، سبب فعال شدن هموسیت می‌شود که نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن سخت‌پوستان دارد. هنگامی که بتاگلوکان وجود داشته باشد، هموسیت برای از بین بردن عوامل بیماری‌زا از طریق فاگوسیتوز یا انتشار مولکول‌های بیواکتیو قوی و پپتیدهای ضد میکروبی 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 بیماری‌زا استفاده شد و زایموزان توانست عملکرد آرتمیا را در برابر این باکتری بهبود ببخشد.

در نتیجه‌گیری کلی، می‌توان بیان نمود که در سیستم گنوتوبیوتیک 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. proteolyticus* و *V. campbellii* نشان دهد. این اولین بار است که زایموزان به عنوان محرک ایمنی در

- 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 β -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.** β -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 β -glucans and bakers yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish*

- 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/jspf.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.

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 franciscana* growth and resistance to *Vibrio campbellii* and *Vibrio proteolyticus* infections in a gnotobiotic system. Artemia nauplii were fed with killed LVS3, about 10.5×10^9 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. proteolyticus* pathogens were added at 5×10^6 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