Archive of SID

بررسی اثر مخمر ساکارومایسیس سروزیه به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

- **مینا آهنگرزاده***: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **مهرداد محمدی‌دوست**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **حسین هوشمند**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **محمد افشارنسب**: بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **سیدرضا سیدمرتضایی**: مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

چکیده

این تحقیق جهت بررسی فاکتورهای ایمنی و میزان بقای میگوی پاسفید غربی تغذیه شده با مخمر ساکارومایسیس سروزیه در مقایسه با میگوهایی که از مخمر استفاده نکرده‌اند انجام گردید. در این مطالعه میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی میگوهای تغذیه‌شده با مخمر ساکارومیسس سرویزیه در مقایسه با تیمار شاهد مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه میگو با وزن متوسط ۳۰ تا ۳۵ گرم از یک استخر پرورش میگوی چوئبده آبادان انتخاب گردید و پس ازاطمینان از سلامتی، عملیات آداپتاسیون انجام شد. میگوها به ۲ گروه (تیمار) ۱۵۰ قطعه‌ای (شامل ۵۰ قطعه میگو در سه تکرار) شامل یک گروه تغذیه شده با غذای معمولی و یک گروه تغذیه شده با غذای حاوی مخمر تقسیم‌بندی شدند. سپس تغییرات فاکتورهای ایمنی و میزان بقا در دو گروه محاسبه و بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که میزان بقاء نسبی در دو تیمار تفاوت معنی داری نداشتند. ولی فاکتورهای ایمنی (THC، TPP، PO، POD و SOD) در تیمار تغذیه شده با مخمر نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). در بحث کلی به‌نظر می‌رسد که مصرف مخمر ساکارومایسیس سروزیه سبب بهبود سیستم ایمنی میگو شده است.

کلمات کلیدی: میگو سفید غربی، مخمر ساکارومایسیس سروزیه، میزان بقا، فاکتورهای ایمنی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.ahangarzadeh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولید جهانی آبزیان با افزایش رو به رشد به ۱۴۸/۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ رسید (FAO، ۲۰۱۲). میزان تولید میگو در کشور از ۷۴۶۲ تن در سال ۱۳۸۲ به ۱۲۶۹۸ تن در سال ۱۳۹۲ رسید و سهم استان خوزستان، ۲۶ تن در سال ۸۲ و ۷۷۱ تن در سال ۹۲ بوده است (سالنامه آماری شیلات، ۱۳۹۲). بیماری‌های میگو یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده فعالیت‌های تکثیر و پرورش در جهان می‌باشد. از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش میگو در سال ۱۹۷۰، بیش از ۵۰ کشور به توسعه این صنعت مبادرت نموده و حجم بالایی از تولیدات آبزی در این کشورها به میگوهای پرورشی اختصاص یافته است. اما بروز برخی از بیماری‌ها بالاخص بیماری‌های ویروسی، اغلب کشورها به‌ویژه کشورهای آسیای جنوب‌شرقی را با مشکلات جدی مواجه نموده است(افشارنسب و همکاران، ۱۳۸۵). Valderrama و Anderson (۲۰۱۱) مهم‌ترین چالش‌های پرورش میگوی سفید غربی عبارت است از بهداشت و بیماری‌ها، قیمت غذا، قیمت جهانی میگو، کیفیت تخم و پست لارو، دسترسی به مولدین عاری از بیماری، کنترل کیفی محصولات تولیدی، قیمت سوخت، ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی، موضوع‌های زیست‌محیطی و زیرساختارها که هرکدام دارای تأثیرات مختلفی بر تولید میگو دارند. سالیانه از ناحیه بیماری‌های میگو بالغ بر ۲۲٪ از میگوی تولیدی در دنیا از بین رفته که رقمی معادل ۶ میلیارد دلار سالیانه به این صنعت خسارت وارد می‌شود. در میان بیماری‌های میگو بیماری ویروسی لکه سفید خسارت زیادی به مزارع پرورشی وارد نموده و پرورش‌دهندگان از بابت این بیماری خسارت سنگینی متحمل شده‌اند. امروزه تلاش بسیاری از محققین در راستای تقویت میگوهای پرورشی در برابر بیماری، معطوف به تقویت و تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میگوهاست و یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر توانایی آبزی برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا وضعیت تغذیه است. بیماری‌ها معمولاً در مواقعی که آبزی تحت تأثیر عوامل استرس‌زای مختلف نظیر تغذیه نامناسب می‌باشد شیوع پیدا می‌کنند. ازاین‌رو برای بهبود وضعیت سلامتی و جلوگیری از شیوع بیماری‌ها در فعالیت‌های آبزی‌پروری، جیره‌های غذایی مناسب مورد نیاز می‌باشند (El-Banna و Atallah، ۲۰۰۹). استفاده از واکسن پایدار و مؤثر در میگو به‌دلیل نداشتن سیستم ایمنی خاطره‌ای تاکنون به‌طور کامل موفقیت‌آمیز نبوده است، در نتیجه استفاده از مکمل‌های افزودنی در جیره غذایی می‌تواند منجر به رشد مطلوب آبزی و کاهش حساسیت نسبت به عوامل بیماری‌زا گردد (Lara-Flores و همکاران، ۲۰۰۳). افزودنی‌های غذایی علاوه بر تقویت سیستم ایمنی با بهبود افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی، باعث افزایش میزان تولید و نهایتاً سوددهی بیش‌تر فعالیت آبزی‌پروری می‌شوند (El-Banna و Atallah، ۲۰۰۹). یکی از راه‌های افزایش ایمنی، کاربرد تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی نظیر بتاگلوکان است که از ترکیبات سازنده دیواره سلولی باکتری‌ها و مخمرها می‌باشد (Tewary و Patra، ۲۰۱۱). مخمر ساکارومیسس سرویزیه، منبع مناسبی از پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری و بسیاری از عناصر معدنی و غیرمعدنی و نیز غنی از ویتامین‌های گروه B است (Ebrahim و Abou-seif، ۲۰۰۸). این مخمر، با تولید متابولیت‌های مختلف موجب افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی و بهبود هضم مواد غذایی، تحریک سیستم ایمنی، افزایش نرخ بقا و نهایتاً افزایش رشد را به‌دنبال دارد (Kafilzadeh و همکاران، ۲۰۱۳؛ He و همکاران، ۲۰۱۱). هم‌چنین اثر مواد تجاری حاصل از متابولیت‌های این مخمر در آبزیان به‌صورت افزایش قدرت ایمنی در مقابل بیماری‌ها به تأیید رسیده است (Tewary و Patra، ۲۰۱۱). لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات استفاده از مخمر ساکارومایسیس سروزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر روی سیستم ایمنی میگو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی فاکتورهای ایمنی (THS، TPP، PO، SOD و POD) میگوهای تغذیه شده با مخمر ساکارومایسس سرویزیه (تهیه شده از مرکز ملی فراورده‌های بیولوژیک و ذخایر زیستی کشور) در مقایسه با میگوهای تغذیه شده بدون مخمر در مرکز تکثیر میگوی بندر امام (ره) متعلق به اداره کل شیلات خوزستان و پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور انجام شد. میگوها در تیمار ۱ به‌مدت ۳۹ روز با جیره حاوی مخمر تغذیه شدند و در طول این مدت میزان بازماندگی و تغییرات فاکتورهای ایمنی در آن‌ها بررسی گردید.

جدول ۱: تیماربندی میگوها مورد آزمایش

نام گروه	نوع تغذیه	تعداد میگو
تیمار ۱	میگوهای تغذیه شده با ۲ گرم در یک کیلوگرم غذا از مخمر ساکارومایسیس سروزیه به‌مدت ۳۹ روز	۵۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۲ (شاهد)	میگوهای تغذیه شده با جیره غذای معمولی	۵۰ قطعه (در سه تکرار)

نمونه‌گیری: جهت بررسی تغییرات شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل، میزان پروتئین کل، آنزیم پراکسیداز، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آنزیم فنل اکسیداز) از همولنف میگوها نمونه‌برداری گردید. نمونه‌گیری بدین‌صورت انجام گردید که، یک‌بار در روز یک (۱۴ روز پس از تغذیه

www.SID.ir

Archive of SID

با مخمر)، روز ۳ (پس از ۱۴ روز تغذیه با مخمر)، روز ۹، روز ۱۸ و روز ۲۵ از هر تکرار در هر بار نمونه‌برداری تعداد ۳ قطعه میگو جهت اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی نمونه‌برداری شد. به‌منظور همولنف‌گیری، از سرنگ‌های انسولین با سوزن شماره ۲۵ پر شده با ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول خنک الزویر اصلاح‌شده (۳۳۶ mM Na citrate، ۲۷ Mm NaCl، Mm glucose ۱۱۵، mM EDTA ۹ و pH ۴،۶) به‌عنوان آنتی‌کواگولانت (ضدانعقاد) استفاده گردید و سپس از طریق سینوس شکمی (بعد از پنجمین پای قدم‌زن) ۰/۶ میلی‌لیتر همولنف از میگو گرفته شد (Redman و Lightner، ۱۹۹۵؛ Jiang و همکاران، ۲۰۰۴).

سنجش شاخص‌های ایمنی: شمارش هموسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد. در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از مخلوط همولنف و ماده ضدانعقاد با ۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فرمالین خنثی ۱۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه مخلوط و نگه داشته شد. سپس از این مخلوط، ۲۰ میکرولیتر نمونه برداشته شد، سپس در شیار H لام نئوبار زیر لامل تخلیه گردید. در ادامه بعد از گذشت ۱ دقیقه شمارش هموسیت‌ها صورت گرفت. شمارش بدین‌صورت است که از ۲۵ خانه وسط ۵ خانه به‌صورت تصادفی شمارش شد و تعداد هموسیت‌ها مطابق فرمول زیر محاسبه گردید (Kakoolaki و همکاران، ۲۰۱۰؛ Jiang و همکاران، ۲۰۰۴):
میانگین شمارش ۵ خانه × ۵ × ۱۰۴ = L/Mix × THC (سلول/میلی‌لیتر)

اندازه‌گیری پروتئین پلاسمای کل TPP (میلی‌گرم/میلی‌لیتر): برای انجام آزمایش TPP از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. دمای سانتریفیوژ ۴ دجه سانتی‌گراد بوده و از هر تیمار ۳ نمونه مخلوط ضدانعقاد و همولنف اخذ و سانتریفیوژ می‌گردد. پس از سانتریفیوژ کردن، همولنف فاقد سلول (پلاسما) جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه به‌روش آنالیز بیوشیمیایی توسط دستگاه RA ۱۰۰۰ Technicon Auto Analyser پروتئین پلاسما به‌روش اصلاحی Lowry سنجیده شده و آلبومین سرم گاو (BSA) به‌عنوان استاندارد درنظر گرفته می‌شود (Bradford، ۱۹۷۶).

سنجش میزان فعالیت آنزیم پروکسیداز: مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول اصلی واکنشی (Master reaction mix) (۴۶ میکرولیتر محلول بافر + ۲ میکرولیتر Fluorescent Peroxidase + ۲ میکرولیتر H2O2 □□۱۲/۵) را در چاهک هر نمونه و کنترل مثبت ریخته و با کمک حرکت افقی و پیپت، به‌خوبی مخلوط شد. سپس پلت چاهک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۳ دقیقه اندازه‌گیری گردید. برای روش رنگ سنجی، میزان جذب در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و برای روش فلورومتریک به‌شرح زیر عمل گردید:
FLUinitial λex=535/λem=585nm (کیت تجاری شرکت Sigma-aldrich)

میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (SOD): ۲۰ میکرو لیتر از محلول نمونه، در دو ظرف و استاندارد ۲ ریخته شد و مقدار ۲۰ میکرو لیتر آب به هرکدام از بلنک ۱ و ۳ افزوده و به‌خوبی مخلوط شد. بعد از آن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از WST به هر یک از محلول‌ها افزوده و مخلوط شد. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده بافر، به هر یک از استانداردهای ۲ و ۳ اضافه و مخلوط شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم به بلانک ۱ نمونه اضافه و کاملاً مخلوط گردید (ازآن‌جاکه سوپراکسید بلافاصله بعد از افزودن آنزیم آزاد می‌شود بهتراست از multiple channel pipette استفاده کنید تا از تأخیر زمانی و غیرهم‌زمانی واکنش‌ها جلوگیری شود). در آخر ظروف نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد، میکروپلت‌ها در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر را قرائت گردید (کیت شرکت Biovision) و مقدار SOD فعال (براساس درصد بازماندگی) با کمک فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{SOD Activity}=\frac{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})-(\text{Asample}-\text{Ablsnk2})}{(\text{Ablank1}-\text{Ablank3})}$$

سنجش میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز (PO): برای سنجش میزان فعالیت آنزیم فنول اکسیداز از روش Huang و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. بدین‌ترتیب که ۲۰ میلی‌لیتر از پلاسما در چاهک اسپکتروفتومتر به‌عنوان یک نمونه ناشناخته و ۲۰ میلی‌لیتر ماده ضدانعقاد در چاهک دیگر به‌عنوان شاهد قرار داده و پس از ۱ دقیقه، ۸۸۰ میلی‌لیتر محلول L-DOPA به هر دو چاهک اضافه شد. میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر، هر ۱۰ ثانیه تا ۱۲۰ ثانیه ثبت گردید. هر یک واحد فعالیت آنزیم معادل تغییر در جذب ۰/۰۰۱ در هر دقیقه در هر میلی‌لیتر همولنف تعریف گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA Two Way) استفاده شد، سپس وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌های به‌دست آمده در سطح احتمال ($p\leq$۰/۰۵) به کمک پس آزمون Duncan، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۹ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده گردید.

نتایج

میزان بقا: مقایسه میزان بقا در دو تیمار تغذیه شده با مخمر ساکارومایسیس (T1) و تغذیه شده با جیره فاقد مخمر (T2) نشان داد که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری را در میزان بقا نشان ندادند (جدول ۲ و شکل ۱).

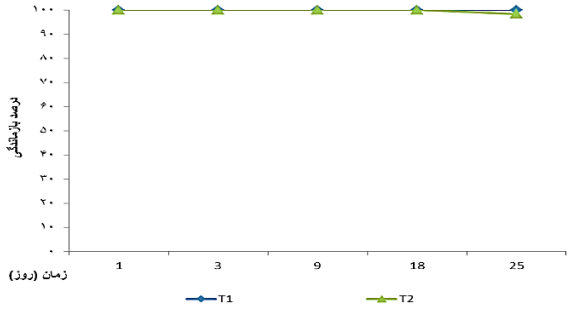
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: نتایج حاصل از بررسی درصد بازماندگی میگوهای پاسفید

تیمار	روز ۱	۳	۹	۱۸	۲۵
T1 (مخمر)	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰b
T2 (شاهد)	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰b	۹۸/۳۳ ±۰/۸۸b

(میانگین±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).



شکل۱: نمودار مقایسه روند درصد بازماندگی در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

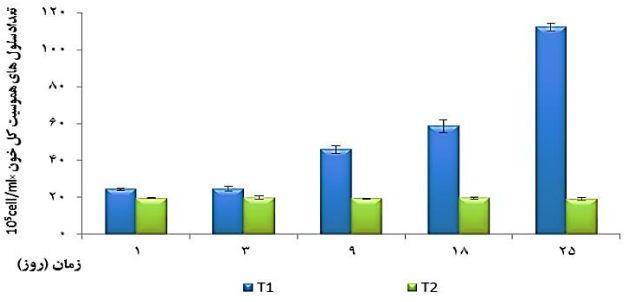
نتایج حاصل از تأثیر مخمر ساکارومایسیس سروزیه بر فاکتورهای ایمنی: میزان فاکتورهای ایمنی در تیماری که مخمر مصرف نموده و تیماری که با جیره معمولی تغذیه شده است، در جدول ۳ آمده است. براساس جدول، میزان کلیه فاکتورهای ایمنی اندازه‌گیری شده(THS، TPP، PO، SOD و POD) در آزمایش بین تیمارهایی که مخمر مصرف نموده‌اند (T1) با تیمارهایی که مخمر مصرف نکرده‌اند (T2) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول۳: نتایج حاصل از بررسی تأثیر مخمر ساکارومایسیس سروزیه بر فاکتورهای ایمنی میگوهای پاسفید

فاکتورهای ایمنی	روز ۱	۳	۹	۱۸	۲۵
			تیمار ۱ (مخمر)		
هموسیت (×۱۰^{۵}cell/ml)	۲۴/۲۹ ± ۰/۶۱^{a}	۲۴/۵۸± ۱/۲۳ a	۴۵/۹۰±۲/۰۷^{b}	۵۸/۶۳±۳/۴۸^{c}	۱۱۲/۲۱±۱/۹۶^{d}
پروتئین کل (mg/ml)	۳۷/۶۵±۰/۱۵^{a}	۳۸/۰۷±۰/۷۶a	۵۳/۷۷±۲/۶۹^{b}	۶۷/۵۷±۰/۲۸^{c}	۷۶/۵۰±۲/۱۰^{d}
آنزیم پروکسیداز (nmol/min^{-1}ml^{-1})	۶/۰۲±۰/۰۳^{a}	۶/۰۹±۰/۰۲ab	۶/۱۹±۰/۰۲^{b}	۶/۳۷±۰/۰۵^{c}	۶/۷۵±۰/۰۹^{d}
سوپراکسیددیسموتاز (Activity Uml^{-1})	۹۹۶/۵۵±۱/۶۹^{a}	۱۰۵۳/۳۳±۴/۵۰a	۱۵۷۶/۶۷±۱۸۱/۱۴^{b}	۱۸۶۶/۶۷±۱۲۰/۱۹^{b}	۲۳۷۳/۳۳±۹۳/۳۳^{c}
آنزیم فنول اکسیداز (U min^{-1}ml^{-1})	۳۹۳/۴۲±۲/۱۹^{a}	۳۹۹/۰۰±۲/۰۸a	۴۴۶/۰۰±۲/۳۱^{b}	۴۹۵/۶۷±۲/۰۳^{c}	۵۷۷/۰۰±۳/۶۱^{d}
			تیمار ۲ (شاهد)		
هموسیت(×۱۰^{۵}cell/ml)	۱۹/۵۳±۰/۱۳^{a}	۱۹/۷۹±۰/۹۷^{a}	۱۹/۱۷±۰/۳۲^{a}	۱۹/۶۲±۰/۵۸^{a}	۱۹/۰۰±۰/۸۶^{a}
پروتئین کل(mg/ml)	۳۳/۷۰±۰/۲۰^{a}	۳۳/۹۵±۲/۶۵^{a}	۳۴/۳۵±۰/۸۵^{a}	۳۳/۲۰±۱/۶۰^{a}	۳۶/۱۰±۲/۸۰^{a}
آنزیم پروکسیداز (nmol/min^{-1}ml^{-1})	۵/۹۰±۰/۰۲^{a}	۵/۷۴±۰/۲۱^{a}	۵/۸۰±۰/۲۸^{a}	۵/۶۹±۰/۴۲^{a}	۵/۸۰±۰/۳۵^{a}
سوپراکسیددیسموتاز (Activity Uml^{-1})	۵۰۳/۹۷±۲/۹۱^{a}	۵۱۰/۰۰±۳۲/۱۵^{a}	۴۹۵/۰۰±۱۵/۰۰^{a}	۴۹۹/۵۰±۲۱/۵۰^{a}	۴۹۶/۰۰±۵/۰۰^{a}
آنزیم فنول اکسیداز (U min^{-1}ml^{-1})	۳۸۶/۵۵±۰/۷۹^{a}	۳۹۰/۰۰±۱/۷۳^{a}	۳۸۱/۳۳±۲۳/۹۲^{a}	۳۷۴/۰۰±۹/۶۴^{a}	۴۱۹/۳۳±۶۶/۲۳^{a}

(میانگین ±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).

میزان هموسیت کل (THC): میزان هموسیت کل در تیمار ۱ (تیماری که‌مخمر مصرف نموده) در مقایسه با تیماری که جیره معمولی دریافت کرده‌است(تیمار ۲) افزایش‌معنی‌دارداشته(P<۰/۰۵)و میانگین این تعداد از ۲۴/۲۹ سلول/میلی‌لیتر در روز یک در تیمار تغذیه شده با مخمر به ۱۱۲/۲۱ سلول/میلی‌لیتر در روز ۲۵ افزایش یافته است (شکل ۲).

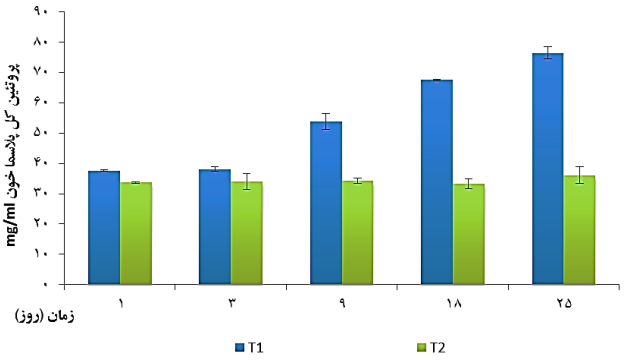


شکل۲: نمودار مقایسه تعداد (میانگین±خطای استاندارد) و روند هموسیت کل در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

www.SID.ir

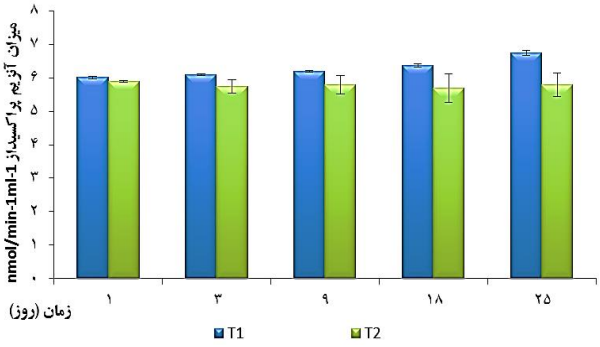
Archive of SID

میزان پروتئین پلاسما (TPP): میزان پروتئین‌های موجود در همولنف در روزهای نمونه‌برداری شده در تیمار T1 (تیماری که مخمر مصرف نموده) بیش‌تر از تیمار T2 (تیماری که جیره معمولی دریافت کرده است) بوده و این اختلاف معنی‌دار است (شکل ۳) (P<۰/۰۵).



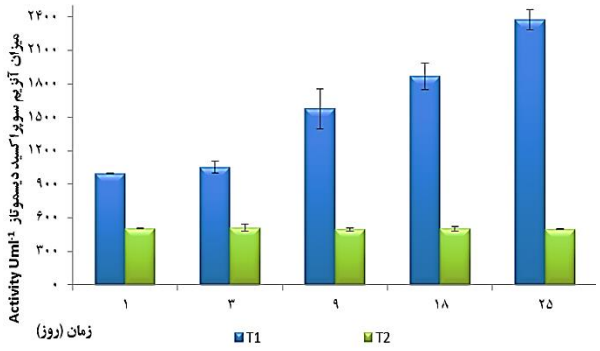
شکل ۳: نمودار مقایسه میزان (میانگین±خطای استاندارد) و روند پروتئین کل در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

میزان آنزیم پراکسیداز (POD): نتایج نشان دادکه میزان POD در تیمار T1 در مقایسه با تیمار T2 بیش‌تر بوده و این اختلاف معنی‌دار است (شکل ۴) (P<۰/۰۵).



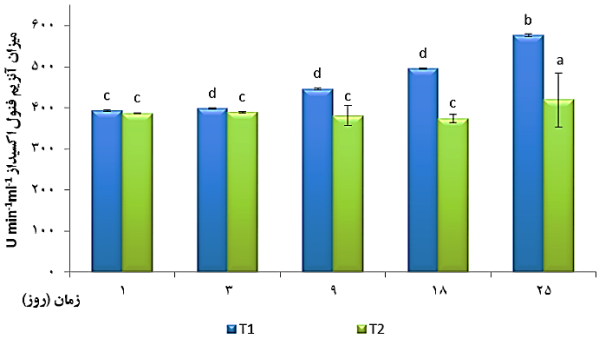
شکل ۴: نمودار مقایسه میزان (میانگین±خطای استاندارد) و روند پراکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD): این آنزیم نقش مهمی در فعالیت‌های حیاتی میگو و حذف رادیکال‌های آزاد بازی می‌کند و میزان و روند آن در این آزمایش در تیمار T1 که مخمر مصرف نموده‌اند با تیمار T2 اختلاف معنی‌داری داشته (P<۰/۰۵) و بیش‌تر می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار مقایسه میزان (میانگین±خطای استاندارد) و روند سوپراکسیددیسموتاز در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

آنزیم فنل اکسیداز (PO): میزان این آنزیم که در فعالیت سیستم proPO ایجاد می‌گردد نقش مهمی در دفع پاتوژن‌ها دارد. میزان PO در تیمار T1 در مقایسه با تیمار T2 (تیماری که مخمر دریافت نکرده است) در این آزمایش بیش‌تر بوده و این اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵) (شکل ۶).



شکل ۶: نمودار مقایسه میزان (میانگین±خطای استاندارد) و روند آنزیم فنول اکسیداز در تیمار آزمایشی شاهد و مخمر

بحث

هموسیت در میگوها نقش مهمی در ایمنی میگو داشته و میزان هموسیت در گردش خون میگو یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده در سلامتی میگوها می‌باشد. سلول‌های لنفاوی کل و تغییرات آن‌ها یکی از شاخص‌های مهم در استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در میگو می‌باشد (Wang و Chen، ۲۰۰۶). هم‌چنین میزان تولید سلول‌های لنفاوی میگو در برابر تغییرات محیطی و یا استری تغییر می‌کند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه انجام شده میزان THC بعد از تغذیه با مخمر ساکارومایسس سروزیه، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان T1 در روز ۲۵ ثبت گردید. این

www.SID.ir

Archive of SID

یافته به این معنی است که این مخمر توانسته موجب تحریک بافت‌های تولیدکننده سلول‌های لنفاوی در میگو شده و موجب افزایش سلول‌های لنفاوی میگو گردد. میگوهایی که از طریق غذا میزان لیپو پلی‌ساکارید (LPS)، بتا ۱-۳ گلوکان و پپیتدوگلیکان به‌صورت انفرادی و یا ترکیبی به آن‌ها رسد از طریق پروتئین‌های الگویی شناسایی (PRP) و یا گیرنده‌های سطحی موجب شناسایی الگوهای شناسایی پاتوژن‌ها شده و با ایجاد یک کمپلکس توانایی افزایش میزان سلول‌های لنفاوی و یا فعالیت‌های میتوزی در بافت‌های خون‌ساز (هماتوپویتیک) را موجب می‌گردند (Chen و همکاران، ۲۰۱۴).

میزان پروتئین کل پلاسما (TPP) نیز شبیه هموسیت کل (THC) یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده سلامتی میگوها بوده و با تغییر سلامتی میگو تغییر می‌کند (Yoganandhan و همکاران، b ۲۰۰۳). در مطالعه حاضر بیش‌ترین میزان TPP در مقایسه بین تیمار T1 و تیمار T2 در تیمار T1 ثبت گردید و میزان آن از ۰/۱۵±۳۷/۶۵ در روز اول به ۲/۱±۷۶/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در روز ۲۵ رسید که در کل روزهای نمونه‌برداری این فاکتور در تیمار T1 بیش‌تر T2 بوده است. یافته حاضر با نتایج مطالعه Subramanian و Philip (۲۰۱۳) هم‌خوانی داشته که عنوان می‌کنند، میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، هم‌چنین فاکتورهای ایمنی TPP و THC در میگوهای تغذیه‌شده با بتا گلوکان افزایش و این فاکتورها بقا بیش‌تری در میگو را به‌دنبال دارند.

فاکتور مؤثر دیگر آنزیم پراکسیداز (POD) موجود در پلاسما بوده که به‌شدت به مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن (ROS= Reactive oxygen species) ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم پارتیکل‌های خارجی می‌باشد (Le Moullac و Haffner، ۲۰۰۰). POD نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (Liu و همکاران، ۲۰۰۰). در مطالعه حاضر میزان POD در زمان مصرف میگوها با جیره حاوی مخمر ساکارومایسیس سروزیه از طریق تشکیل ROS و تولید DO، تولید بالائی از POD نمودند. این نتایج با نتایج حاصل از Lin و همکاران (۲۰۱۱) و Wen-ying و همکاران (۲۰۰۷)، هم‌خوانی دارد. Lin و همکاران (۲۰۱۱)، مشخص نمودند ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بتاگلوکان موجب تحریک ۶ آنزیم شامل POD، SOD، ALP و PO می‌گردد. یکی از آنزیم‌های مؤثر دیگر در واکنش‌های دفاعی میگوها آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) بوده که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیرهوازی پدید می‌آید. این آنزیم نیز در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر میزان SOD در تیمار تغذیه شده با مخمر از ۱/۶۹±۹۹۶/۵۵ در روز اول نمونه‌گیری بعد از ۱۴ روز تغذیه با جیره حاوی مخمر به ۹۳/۳۳±۲۳۷۳ واحد/میلی‌لیتر در روز ۲۵ پس از تغذیه با مخمر رسید و این میزان از گروه شاهد بیش‌تر بوده و هم‌چنین در گروه شاهد روند افزایشی مشاهده نشد Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند، میگوهای تغذیه‌شده با بتا ۱ و ۳ گلوکان، ویتامین E و بتاکاروتن نشان‌دهنده یک افزایش معنی‌داری در میزان SOD در هپاتوپانکراس و عضلات بعد از ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت بوده است. نتایج تحقیق Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) و Chang و همکاران (۲۰۰۳) با نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی موجب افزایش SOD در میگوی ببری سیاه شده است.

آنزیم دیگری که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل‌اکسیداز (PO) می‌باشد. سیستم پروفنل‌اکسیداز (proPO) یکی از اجزا سیستم دفاعی میگو می‌باشد. این سیستم بالاخص در شناسایی اجزا غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد (Van de Braak، ۲۰۰۲).

فعال‌شدن این آنزیم توسط تعداد زیادی از تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی شامل پپتیدوگلیکان (Cerenius و Söderhäll، ۲۰۰۴)، بتاگلوکان (Cerenius و Söderhäll، ۲۰۰۴؛ Bai و همکاران، ۲۰۱۴) و لیپوپلی‌ساکارید (Lorenzo و همکاران، ۱۹۹۹؛ Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰) انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر نیز به‌علت مصرف مخمر ساکارومایسس سروزیه در جیره غذایی میگوها این فعال‌سازی اتفاق افتاده است و یک افزایش معنی‌داری، بین تیمار تغذیه شده با مخمر و تیمار شاهد مشاهده می‌شود. هم‌چنین در مقایسه بین روزهای نمونه‌گیری شده در تیمار تغذیه شده با مخمر یک روند افزایشی در میزان PO کاملاً مشهود است.

به‌طورکلی با توجه به این که در میگوها سیستم ایمنی دارای سلول‌های خاطره‌ای نیستند بایستی ترکیبات محرک و یا مسدود کننده گیرنده‌های ویروسی در سلول‌های بدن میگو به‌صورت مداوم در اختیار میگو قرار گیرند و مخمر مورد نظر به‌دلیل سهل الوصول بودن و اثرات مثبت در افزایش سیستم ایمنی یکی از روش‌های ایمن و بی‌ضرر برای میگو و محیط زیست بوده و می‌توان به‌راحتی و از طریق خوراک در اختیار میگوها قرار داد.

منابع

۱. **افشارنسب، م.؛ محمدی‌دوست، م.؛ قوام‌پور، ع.؛ متین‌فر، ع. و سیدمرتضایی، س.، ۱۳۸۵.** احیاء پرورش میگو در سایت چوئبده آبادان با رعایت اصول بهداشتی. موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۲. **سالنامه آماری شیلات. ۱۳۹۲.** سازمان شیلات ایران، مدیریت طرح و برنامه.

۳. **Bai, N.; GU, M.; Zhang, W.; Xu, W. and Mai, K., 2014.** Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white

www.SID.ir

Archive of SID

shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. Aquaculture. Vol. 426, pp: 66-73.

۴. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing protein–dye binding. Anal Biochem. Vol. 72, pp: 248-254.

۵. **Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2004.** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews. Vol. 198, pp: 116-126.

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

۷. **Chen, Y.Y.; Chen, J.C.; Lin, Y.C.; Kitikiew, S.; Li, H.F.; Bai, J.C.; Tseng, K.C.; Lin, B.W.; Liu, P.C.; Shi, Y.Z.; Kuo, Y.H. and Chang, Y.H., 2014.** Endogenous molecules induced by a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) elicit innate immunity in shrimp. PLoS One. Vol. 9, No. 12.

۸. **Ebrahim, M. and Abou-Seif, R., 2008.** Fish meal replacement by yeast protein (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with biogenic L-carintine as a source of methionine plus lysine mixture in feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. 8th international symposium on Tilapia in aquaculture. Central Laboratory for Aquaculture Research, Agriculture Research Center, Cairo, Egypt.

۹. **El-Banna, S. and Atallah, S., 2009.** Study the Role of Feed Additives in Prevention of Fish Diseases Incidence in *Oreochromis niloticus* and Common Carp Fish and Its Economic Importance. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 4, No. 2, pp: 121-140.

۱۰. **FAO Fisheries Department. State of world Aquaculture. 2012.** FAO Fisheries Technical Paper. Rome. 209 p.

۱۱. **He, W.; Cui, J.; Yue, Y.; Zhang, X.; Xia, X.; Liu, H. and Lui, S., 2011.** High-performance TiO 2 from Baker's yeast. Journal of colloid and interface science.Vol. 354, pp: 109-115.

۱۲. **Huang, J.; Yang, Y. and Wang, A., 2010.** Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 28, pp: 240-244.

۱۳. **Jiang, G.; Yu R. and Zhou M., 2004.** Modulatory effects of Ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicas* to virulence of white spot syndrome virus. Aquaculture. Vol. 241, pp: 61-75.

۱۴. **Kafilzadeh, F.; Farhangdoost, M.S. and Tahery, Y., 2013.** Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. African Journal of Biotechnology. Vol. 9, pp: 6721-6726.

۱۵. **Kakoolaki, S.; Sharifpour, I.; Soltani, M.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.; Mirzargar, S. and Rostami, M., 2010.** Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 9, pp: 219-232.

۱۶. **Kumar, S.; Ahamed, V.; Sarathi, M.; Basha, A. and Hameed, A., 2008.** Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 24, pp: 467-478.

۱۷. **Lara-Flores, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Guzmán-Méndez, B.Z.E. and López-Madrid, W., 2003.** Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 216, pp: 193-201.

۱۸. **Le moullac, G. and Haffner, P., 2000.** Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. Vol. 191, pp: 121-131.

۱۹. **Lightner, D.V.; Redman, R.M.; Hasson, K.W. and Pantoja, C.R., 1995.** Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. Dis. Aquat. Org. Vol. 21, pp: 53-59.

۲۰. **Lin, Y.C.; Yeh, S.T.; Li, C.C.; Chen, L.L.; Cheng, A.C. and Chen, J.C., 2011.** An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp Litopenaeus vannamei challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 31, pp: 1239-1246.

۲۱. **Liu, Y.; Jang, X.L.; Lv, Q. and Guan, H.S., 2000.** Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis. Journal of Fisheries of China. Vol. 24, pp: 549-553.

۲۲. **Lorenzo, S.; De Guarrini, S.; Smith, V.J. and Ferrero, E.A., 1999.** Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 9, pp: 31-50.

۲۳. **Pacheco, R.; Ascencio, F.; Zarain, M.; Gomez, G. and Campa, A., 2011.** Enhancement of superoxide dismutase and

www.SID.ir

Archive of SID

catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β-1.3 glucan vitamin E, and β-carotene and infected with white spot syndrome virus. Lat. Am. J. Aquat. Res. Vol. 39, pp: 534-543.

۲۴. **Subramanian, S. and Philips, R., 2013.** Identification of haematological markers in shrimp health assessment from the immune profile of *Fenneropenaeus indicus* on b-1,3-glucan administration and white spot syndrome virus challenge. Aquacult Int. Vol. 21, pp: 1169-1184.

۲۵. **Takahashi, Y.; Kondo, M.; Itami, T.; Honda, T.; Inagawa, H.; Nishizawa, T.; Soma, G.I. and Yokomizo, Y., 2000.** Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 10, pp: 555-558.

۲۶. **Tewary, P. and Patra, B., 2011.** Oral administration of baker's yeast. Saccharomyces cerevisiae. pp: 1-7.

۲۷. **Valderrama, D. and Anderson, J.L., 2011.** Shrimp production review. Food and Resource Economics Department, University of Florida, USA. Santiago, Chile. November, pp: 6-9.

۲۸. **Van De Braak, C.B.T., 2002.** Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PhD thesis, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Sciences. PO Box 338, 6700 AH Wageningen, the Netherlands. pp: 168.

۲۹. **Wang, F. I. & Chen, J. C., 2006.** Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to Photobacterium damselae subsp. damselae. Fish Shellfish Immunol. Vol. 20, pp: 671-681.

۳۰. **Wen-Ying, S.; Hui-Jun, Y.; Hui-Feng, K.E. and Lan, Q.I., 2007.** Effect of β-glucan on Enzyme Activity of Immunity in Pacific White Leg Shrimp *Litopenaeus vannmei*. Fisheries Science. 7 p.

۳۱. **Yoganandhan, K.; Thirupathi, S. and Sahul Hameed, A.S., 2003b.** Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, Penaeus indicus. Aquaculture. Vol. 221, pp: 1-11.

www.SID.ir