شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۳۸۵-۳۷۳

تاثیر دو محرک ایمنی نایسین و لاکتوفرین بر رشد و مقاومت آرتمیا (*Artemia fransiscana*) به عفونت *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolitycus* در سیستم آزمایش گنوتوبیوتیک (Gnotobiotic)

مه لقا کرمی شیرازی[۱]، ایمان سوری نژاد[۲*]، سیاوش سلطانیان[۳]

۱. کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۳. استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸

چکیده

در مطالعه حاضر تاثیر محرک‌های ایمنی نایسین و لاکتوفرین بر رشد و بقای آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia fransiscana*) در چالش با *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolitycus* در شرایط گنوتوبیوتیک بررسی شد. آرتمیا به مدت پنج روز در شرایط گنوتوبیوتیک نگهداری و کشت داده شد و سپس ناپلی‌های آرتمیا با باکتری کشته شده *LVS3* (سویه‌ای از *Aeromonas hydrophyla*) به تعداد $۱۰/۵ \times ۱۰^{۹}$ سلول بر لوله فالکون در هر روز غذادهی شدند. همچنین لاکتوفرین و نایسین به مقدار مورد نیاز به صورت روزانه به فالکون‌ها اضافه شدند. در روز سوم پاتوژن‌های *V. campbellii* و *V. proteolyitus* در تراکم ۵×۱۰^{۶} *cell/ml* اضافه گردیدند. این آزمایش شامل شش تیمار بود که تیماری که در آن آرتمیا فقط از باکتری کشته شده تغذیه شده بود به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. هر تیمار شامل چهار تکرار بود و در روز ششم میزان بازماندگی، رشد طولی ناپلی‌ها و زیست توده (زیتوده) کل تولید شده بررسی گردید. لاکتوفرین باعث افزایش درصد بقای روزانه، درصد نسبی بقا و زیست توده کل تولید شده در مقابل *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolitycus* شد، اما تفاوت معنی دار تنها در زیست توده کل تولید شده حاصل شد ($p<۰/۰۵$). نایسین باعث افزایش درصد بقای روزانه، درصد نسبی بقا و زیست توده کل تولید شده در مقابل *Vibrio campbellii* و *Vibrio proteolitycus* شد، اما تفاوت معنی دار تنها در زیست توده کل تولید شده حاصل شد ($p<۰/۰۵$). همچنین در طول فردی آرتمیا در تیمار لاکتوفرین در برابر *Vibrio proteolitycus* افزایش معنی دار حاصل شد. به طور کلی نتایج نشان داد که استفاده از لاکتوفرین و نایسین به عنوان محرک ایمنی می‌تواند باعث افزایش مقدار کل زیست توده شود و مقاومت آرتمیا را نسبت به عفونت ویبریو در محیط گنوتوبیوتیک افزایش دهد.

واژگان کلیدی: آرتمیا فرانسیسکانا، گنوتوبیوتیک، عفونت باکتریایی، محرک ایمنی، زیست توده.

* نویسنده مسئول: ایمان سوری نژاد
Email: sourinejad@hormozgan.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 3, Autumn 2022
pp. 373-385

Effects of Nisin and lactoferrin immunostimulants on growth and resistance to pathogenic Vibrios in gnotobiotic Artemia test system (GART)

Mahlagha Karami Shirazi[1], Iman Sourinejad[2*], Siavosh Soltanian[3]

1. M.Sc. Department of Fishery, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandarabas, Iran
2. Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandarabas, Iran
3. Associate Professor, Department of Fishery, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandarabas, Iran

Received: 21-Oct-2021 **Accepted: 08-Jan-2022**

Abstract

In this study, the effect of immunostimulants nisin and lactoferrin on the growth and survival of *Artemia fransiscana* in challenge with *Vibrio campbellii* and *Vibrio proteolitycus* under gnotobiotic conditions was investigated. Artemia was kept and cultured in gnotobiotic conditions for five days, and then Artemia nauplii were fed with killed LVS3 bacteria (a strain of *Aeromonas hydrophyla*) at the number of 10.5 x 109 cells per Falcon tube every day. Also, lactoferrin and nisin were added to the falcons in the required amount on a daily basis. On the third day, the pathogens *V. campbellii* and *V. proteolyitus* were added at a concentration of 5 x 106 cells/ml. This experiment included six treatments, the treatment in which was fed only with killed bacteria was considered as the control treatment. Each treatment consisted of four repetitions, and on the sixth day, the survival rate, longitudinal growth of nauplii and the total biomass (biomass) produced were checked. Lactoferrin increased daily survival percentage, relative survival percentage and total biomass produced against *Vibrio campbellii* and *Vibrio proteolitycus*, but a significant difference was obtained only in total biomass produced ($p<0.05$). Nisin increased the daily survival percentage, relative survival percentage and total biomass produced against *Vibrio campbellii* and *Vibrio proteolitycus*, but a significant difference was obtained only in the total biomass produced ($p<0.05$). Also, there was a significant increase in the individual length of *Artemia in lactoferrin* treatment against *Vibrio proteolyticus*. In general, the results showed that the use of lactoferrin and nisin as immune stimulants can increase the total amount of biomass and increase the resistance of Artemia to *Vibrio* infection in gnotobiotic environment.

Keywords: *Artemia fransiscana*, Gnotobiotic, Bacterial infection, Immunostimulants, Biomass.

Corresponding author: Iman Sourinejad Email: sourinejad@hormozgan.ac.ir

۱. مقدمه

یکی از مهم‌ترین خطراتی که پرورش‌دهندگان آبزیان با آن مواجه هستند، کاهش میزان بقا خصوصاً در مراحل اولیه زندگی است. از این جهت تقویت و ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن آبزیان از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکرد محققان در این راستا است (Shalaby *et al*., 2006). سیستم ایمنی در بی‌مهرگان برای مبارزه با بیماری‌های عفونی به پاسخ ایمنی غیراختصاصی یا ذاتی بستگی دارد. استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی که مکانیسم دفاعی یا پاسخ ایمنی موجودات هدف را افزایش می‌دهند یک ابزار پیشگیری مناسب در برابر عوامل بیماری‌زا ی‌باشد (Soltanian *et al*., 2007a). استفاده از این محرک‌ها با هدف تقویت سیستم ایمنی آبزیان خصوصاً مکانیسم‌های دفاعی غیراختصاصی برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها و کنترل آن‌ها در آبزی‌پروری به کار می‌رود. محرک‌های ایمنی قادر به افزایش قدرت دفاعی و خنثی کردن فعالیت پاتوژن‌ها یا عوامل بیماریزای فرصت طلب بوده و از این رو باعث بهبود رشد و کاهش مرگ و میر در سرتاسر دوره تولید در آبزیان می‌شوند. به طور کلی استفاده از محرک‌های ایمنی در غذای آبزیان باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر عوامل گوناگون عفونت‌زا می‌شود (Mukherjee and Sahoo, 2002; Couso *et al*., 2003). این افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی احتمالاً تحت تاثیر سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی و مکانیسم دفاعی خونی است (Kwak *et al*., 2003). محرک‌های ایمنی همچنین باعث افزایش فعالیت سیستم کمپلمان خون (Engestad *et al*., 1993)، افزایش فعالیت لیزوزیم سرم (Engestad *et al*., 1993; Jorgensen *et al*., 1993)، تولید آنتی‌بادی بیشتر توسط گلبول‌های سفید خون (Ainsworth and Chen, 1990) و افزایش مقاومت در برابر استرس‌هایی نظیر کمبود اکسیژن، دما و شوری (Yashida and Kitao, 1986) شده‌اند.

تجزیه و تحلیل دقیق نتایج بدست آمده از کاربرد محرک‌های ایمنی در بی‌مهرگان نشان می‌دهد که صحت برخی از یافته‌ها عمدتا به دلیل طراحی ضعیف آزمایش، فقدان تجزیه و تحلیل آماری مناسب و تکرار پذیری ضعیف نتایج ممکن است قابل اطمینان نباشد (Smith *et al*., 2003). بنابراین نیاز فوری به ارائه شواهد صریح از سودمندی اثرات محرک‌های ایمنی در کاهش حساسیت بی‌مهرگان به بیماری یا عفونت در آزمایش‌های استاندارد شده و تحت شرایط پرورشی کنترل شده است. تا با تحقیق روی مکانیسم‌های دفاعی این فرایندها تکمیل و مورد صحت بیشتری قرار گیرد. این آزمایش‌ها می تواند با کشت و پرورش گنوتوبیوتیک بی‌مهرگان (نگهداری حیوانات در یک محیط میکروبی کاملا کنترل شده، gnotobiotic) اجرا شود (Smith *et al*., 2003).

آرتمیا چندین ویژگی قابل توجه زیستی دارد و امکان استفاده بالقوه از آن را به عنوان یک مدل برای تحقیقات در حوزه زیست شناسی جانوری و شرایط گنوتوبیوتیک را فراهم کرده است (Marques *et al*., 2005). امکان پرورش تحت شرایط بدون عامل بیماریزا axenic و تحت کنترل با عوامل خاص بیماریزا gnotobiotic با استفاده از انواع مختلف منابع تغذیه‌ای و با استفاده از روش‌های تجربی ساده (Verschuere *et al*., 2000) را داشته و با توجه به دارا بودن زمان تولید مثل کوتاه (دو تا سه هفته) و تحت شرایط مطلوب می‌تواند برای چند ماه زندگی کند و در کمتر از چند روز از ناپلیوس به بزرگسال برسد (Van Stappen, 1996). مقدار زیادی از سیستم‌های گونه‌های مختلف با زمینه‌ی ژنتیکی متفاوت در دسترس است (Bossier *et al*., 2004) و نهایتا اینکه آرتمیا موجودی کوچک است که به راحتی می‌تواند با تراکم بالا و یا در مقیاس کوچک با استفاده از سیستم‌های کشت بسیار ساده پرورش داده شود.

لاکتوفرین یک نوع گلایکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون، متعلق به خانواده ترانسفرین ها و دارای ساختار مولکولی یکسان در تمام موجودات زنده‌است (Gonzalez–Chavez *et al*., 2009). لاکتوفرین در مقیاس تجاری از شیر گاو استخراج می شود

(Steijns, 2004). نایسین تولید شده توسط گونه‌های مختلفی از لاکتوکوکوس لاکتیس، به زیرگروهی از باکتریوسین‌ها به نام لانتی بیوتیک‌ها تعلق دارد. لانتی بیوتیک‌ها پپتیدهای کوچک و مقاوم به گرما هستند و در ساختمان خود اسیدآمینه لانتیونین و متیل لانتیونین دارند. لانتی بیوتیک‌ها به دو زیر گروه طبقه‌بندی می‌شوند؛ یکی از این زیر گروه‌ها ساختمان کشیده و انعطاف‌پذیر با بار مثبت دارد و به عنوان دریچه ای در ساختمان غشای گونه های هدف عمل کرده و نفوذ پذیر است. اثرات محافظتی و کاربرد چندین نوع از محرک‌های ایمنی مثل بتا-گلوکان‌ها و کیتین (Soltanian *et al.*, 2007a; Marques *et al.*, 2006a) و مخمرنان و برخی از باکتری‌ها (Marques *et al.*, 2006b) در آرتمیا در برابر عوامل بیماری زای میکروبی در شرایط گنوتوبیوتیک بررسی شده است.

با توجه به توضیحات ارائه شده و عدم وجود گزارش‌های قبلی در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی لاکتوفرین و نایسین در سیستم گنوتوبیوتیک پرورش آرتمیا در کشور ایران، مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر محرک ایمنی لاکتوفرین و نایسین بر افزایش مقاومت *Artemia fransiscana* در برابر عفونت باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolitycus* و همچنین تاثیر این محرک‌های ایمنی بر رشد آرتمیا در شرایط آزمایش گنوتوبیوتیک صورت گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. گونه‌های باکتری و شرایط رشد

در این تحقیق سه گونه باکتری شامل باکتری LVS3 (سویه‌ای از *Aeromonas hydrophyla*)، باکتری LMG21363 سویه‌ای از (*Vibrio campbellii*) و باکتری CW8T2 (سویه‌ای از *Vibrio proteolytiqus*)، مورد استفاده قرار گرفت. آئروموناس هیدروفیلا نقش تغذیه کنندگی آرتمیا را داشته و در غلظت مطلوب تاثیر مثبت بر رشد و بقا آن دارد، در حالی که از دو باکتری دیگر به عنوان باکتری‌های بیماری‌زا برای چالش میکروبی آرتمیا استفاده گردید. کشت خالص سویه باکتریایی از آزمایشگاه اکولوژی و فناوری میکروبی و از آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشگاه گنت (Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Gent University, and the Laboratory of Microbiology Gent University) تهیه شد. ابتدا کشت خالص باکتری‌ها از دمای ۷۲- درجه سانتی‌گراد برداشت شد و پس از یخ زدایی در دمای اتاق روی محیط کشت مارین آگار 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 اسپکتروفتومتر استفاده گردید. آرتمیا از LVS3 کشته شده (اتوکلاو شده) با استفاده از مقادیر یکسان تغذیه شد (*Soltanian et al.*, 2007).

۲.۲. تعیین تراکم باکتری به وسیله اسپکتروفتومتری

پس از کشت باکتری‌ها در محیط کشت مارین براث ۲۲۱۶، برای تعیین تراکم باکتری ها، 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 محیط کشت از باکتری‌ها، آب دریای فیلتر و اتوکلاو شده اضافه گردید و به طور کامل بهم زده شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. پس از ۲ 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 ا ستفاده شد (Toi *et al*., 2014). برای تعیین تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر، مقدار یک سی سی از هر فالکون به وسیله سمپلر برداشت شد و در ۳ لوله آزمایش به طور جداگانه ریخته شد. در صورت نیاز رقیق سازی باکتری‌ها صورت گرفت. ابتدا اسپکتروفتومتر با آب دریای اتوکلاوشده کالیبره گردید و سپس هریک از نمونه‌های باکتری در ۳ تکرار به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. عدد به دست آمده در رابطه زیر قرار گرفت که در این رابطه DF میزان رقیق سازی و OD عدد خوانده شده توسط اسکپتروفتومتر است (Toi *et al*., 2014).

رابطه ۱: = مقدار باکتری در هر میلی‌لیترآماده سازی 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 گردیده 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*., 2007a) .

کشت گنوتوبیوتیک آرتمیا

آزمایش با سیست آرتمیا فرانسیسکانا 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 با استفاده از روش پوسته‌زدایی و تخم‌گشایی زدوده شد. پس از تخم‌گشایی سیستها، ۲۰ ناپلی (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 شد. مقدار کل LVS3 مرده که برای یک دوره تغذیه ۵ روزه در اختیار آرتمیا قرار گرفت، در حدود $۱۰/۵ \times ۱۰^{۹}$ سلول در هر لوله فالکون بود.

۲.۳. پوسته‌زدایی

پوسته‌زدایی با استفاده از روش Sorgeloos و همکاران (۱۹۸۶) انجام شد. به این صورت که ابتدا یک گرم سیست آرتمیا فرانسیسکانا به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آبدهی و هوادهی شد. از این مرحله به بعد همه دستکاری‌ها زیر هود انجام گردید. بعد از این مرحله، محلول پوسته زدایی (DS[1]) آماده شد، بدین صورت که به ازای یک گرم سیست ۱۴ میلی لیتر محلول طبق رابطه ۲ فراهم شد.

رابطه ۲:
14 CC: 10 CC NaOCl5% +0 .33 cc NaOH 40% + 3.67 CC water
1 gr cyst + 14 cc Decapsulating solution

سپس سیست‌های آبدهی شده به محلول اضافه شد و هوادهی انجام گردید. بعد از دو تا سه دقیقه که رنگ سیست‌ها از قهوه ای به نارنجی تغییر کرد، در توری با چشمه ۱۰۰ میکرون ریخته شده و با آب شستشو داده شدند. در مرحله بعد برای حذف کلر احتمالی، سیست‌ها با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ درصد به مدت یک دقیقه همراه با هوادهی مخلوط گردید و بعد به طور کامل با آب ضد عفونی شده شستشو داده شدند.

۲.۴. 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، روی آگار دریایی کشت داده شد و یا آلودگی باکتریایی احتمالی آن‌ها بعد از رنگ‌آمیزی با Tetrazalium salt MTT کنترل شد. در تمام آزمایش‌ها قبل از چالش میکروبی، با استفاده از

[1] Decapsulating solution

روش‌های بیان شـــده، آلودگی میکروبی کنترل شـــد و لوله‌های حاوی کشـــت آلوده حذف گردیده و تیمار دوباره تکرار شد.

۲.۵. آماده سازی نایسین و لاکتوفرین

برای ا ستفاده از لاکتوفرین و نایسین از روش Agh و Sorgeloos (۲۰۰۵) استفاده گردید. لاکتوفرین و نایسین از شـــرکت ســـیگما خریداری شـــد. به دلیل اینکه ذرات نایســـین و لاکتوفرین بزرگتر از ۵۰ میکرون هســـتند و درآب حل نمی شـوند برای اسـتفاده بهینه از آن‌ها باید از روش غنی‌سازی استفاده شود. بدین ترتیب غنی سازی به روش Agh و Sorgeloos (۲۰۰۵) طبق راب طه ۳ ان جام شد:

رابطه ۳:

۲ گرم امول سیون /ICES/0 + ۰/۲ یا ۰/۴ گرم از ماده برای ساخت محلول ۱۰درصد و ۲۰درصد + ۱۰۰ میلی لیتر آب

از این محلول، ۲۰ میلی لیتر به ازای ۲۰۰۰۰۰ ناپلی در یک لیتر آب ا ستفاده شد و با محا سبه مقدار مورد نیاز برای ۲۰ عدد ناپلی در ۳۰ میلی‌لیتر آب محلول مورد نظر تهیه گردید. قابل ذکر اسـت پس از تهیه این محلول برای ورود ذرات به امولســیون چربی و قابل جذب شــدن برای آرتمیا محلول مورد نظر به طور کامل هم زده شد سپس به مدت ۵ دقی قه در ح مام آب با د مای ۸۵ در جه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از اینکه به خوبی مخلوط شد به اندازه م صرف روزانه تق سیم و در یخچال نگهداری شد.

۲.۶. طراحی آزمایش

دو آزمایش به صورت مجزا برای تایید تکرارپذیر بودن انجام شد که طراحی این آزمایش‌ها در جدول ۱ ارائه شده ا ست. این آزمایش شامل شش تیمار بود که تیماری که در آن آرتمیا فقط از باکتری کشـــته شـــده تغذیه شـــده (ردیف ۱) به عنوان تیمار شـــاهد بود و هر تیمار دارای چهار تکرار بود. در آزمایش ۱ و ۲ به طور کلی ناپلی‌های آرتمیا با LVS3 در حدود $۱۰^{۹}$ × ۱۰/۵ ســـلول بر لوله فالکون در هر روز غذادهی شـــدند. همچنین محرک‌های ایمنی به مقدار مورد نیاز به صـــورت روزانه به فالکون‌ها اضـــافه شـــدند. در روز ســـوم پاتوژن‌های *V. campbellii* (VC) و *V. proteolitycus* (VP) در تـــراکـــم ۵×۱۰^{۶}cell/ml اضافه گردید. در تیمار شاهد فقط غذادهی انجام شد و چالش داده شد (Soltanian *et al.*, 2007).

جدول ۱- طراحی آزمایش‌های ۱ و ۲ در دوره شش روزه مطالعه حاضر

آزمایش یک و دو	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+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمار پنج	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی+VP	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده
تیمارشش	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی+ VC	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	باکتری کشته شده+ محرک ایمنی	برداشت و شمارش آرتمیاهای زنده

Vibrio campbellii (VC), *Vibrio proteolitycus* (VP)

۲.۷. 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 به وسیله 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 اندازه گیری طول فردی (*IL*)[2] با لوگل فیکس شدند و پس از قرار دادن روی لام، توسط لوپ و دستگاه دیجیتایزر اندازه گیری شدند. زیست توده کل تولید شده (*TBP*)[3] که ترکیبی از هر دو پارامتر بازماندگی و طول فردی است با توجه به رابطه زیر تعیین گردید.

رابطه ۴:

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

۲.۸. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

۳. نتایج

۳.۱. درصد بازماندگی روزانه

در هر دو تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii* درصد بازماندگی در روز چهارم، پنجم و ششم درصد بازماندگی در آرتمیاهای که با LVS3 کشته شده و لاکتوفرین (تیمار لاکتوفرین) تغذیه شده بودند نسبت به آرتمیاهایی که فقط با LVS3 کشته شده (تیمار شاهد) تغذیه شده بودند بالاتر بود اما اختلاف معنی داری ندا شتند ($p>۰/۰۵$). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری‌زا (روز چهارم تا ششم) در صد بازماندگی کاهش یافت. درصد نسبی بازماندگی در روز ششم در تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii* درصد نسبی بازماندگی در تیمار لاکتوفرین و تیمار شاهد اختلاف معنی دار نداشتند ($p>۰/۰۵$). نتایج حاصل از تحلیل اثر لاکتوفرین و نایسین بر عملکرد آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده در آزمون چالش با *Vibrio campbellii* (VC) و *Vibrio proteolitycus* (VP) در جداول ذیل ارائه شده است. نتایج حاصل از اثر لاکتوفرین در دو آزمایش جداگانه در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

۳.۲. طول فردی آرتمیا (میلی متر)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* ، طول فردی آرتمیا در تیمار لاکتوفرین نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود و اختلاف معنی دار داشتند ($p<۰/۰۵$). در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، طول فردی آرتمیا در تیمار لاکتوفرین و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p>۰/۰۵$).

۳.۳. زیست توده کل تولید شده (میلی متر بر فالکون)

در تیمارهای چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii*، زیست توده کل تولید شده در تیمار لاکتوفرین نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود و تفاوت معنی‌داری ایجاد نمود ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از اثر نایسین در دو آزمایش جداگانه در جدول ۴ و ۵ نشان داده شده است.

[1] daily survival
[2] individual length (IL)
[3] total biomass production (TBP)
[4] Relative percentage of survival

جدول ۲- درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی برحسب میلی‌متر، زیست توده کل تولید شده بر حسب میلی متر بر فالکون آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده و یا به همراه لاکتوفرین بعد از پنج روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolitycus* چالش داده شده است (آزمایش۱).

تیمار	بقاروزانه (٪)			درصد نسبی بقا (٪)	طول فردی (میلی‌متر)	زیست توده کل تولید شده
	روز چهارم	روز پنجم	روزششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۸۵/۳۹±۹/۲۱^{ab}	۸۵/۳۹±۹/۲۱۷^{bc}	۸۵/۳۹±۹/۲۱^{bc}	-	۱/۷۵±۰/۰۵^{a}	۳۴/۲۴±۱/۳۳^{c}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۷۴/۴۳±۱/۱۸^{ab}	۷۴/۴۳±۱/۱۸^{abc}	۷۳/۵۷±۱/۲۹^{b}	۸۶±۰/۲۶^{a}	۱/۷۳±+۰/۰۴^{a}	۳۰/۷۷±۳/۲۰^{c}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۷۰/۹۱±۵/۶۲^{a}	۶۳/۲۴±۷/۲۹^{a}	۵۳/۰۱±۲/۸۷^{a}	۶۲±۰/۰۸^{a}	۱/۶۷±۰/۰۱^{a}	۲۱/۳۹±۱/۷۳^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{b}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{c}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{c}		۱/۷۰±۰/۰۴^{b}	۳۴/۱۰±۰/۸۲^{d}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین و چالش داده شده با VP	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{ab}	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{bc}	۸۰/۳۰±۶/۴۶^{bc}	۸۹±۰/۰۷^{a}	۱/۷۳±+۰/۰۱^{b}	۳۳/۳۰±۰/۷۵^{d}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین و چالش داده شده با VC	۷۶/۴۶±۹/۸۸^{ab}	۷۱/۸۵±۴/۰۴^{ab}	۶۸/۳۰±۲/۱۷^{a}	۷۵±۰/۰۲^{a}	۱/۶۶±۰/۰۳^{a}	۲۸/۷۵±۰/۵۳^{b}

-حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف در بالای اعداد نشانه تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد است (p<۰/۰۵).

جدول ۳- درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی برحسب میلی‌متر، زیست توده کل تولید شده بر حسب میلی متر بر فالکون آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده و یا به همراه زایموزان بعد از پنج روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolitycus* چالش داده شده است (آزمایش ۲).

تیمار	بقاروزانه(٪)			درصد نسبی بقا (٪)	طول‌فردی (میلی‌متر)	زیست توده کل تولید شده
	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۸۵/۳۹±۹/۲۱^{a}	۷۸/۹۳±۷/۸۲^{bc}	۷۸/۹۳±۷/۸۲^{bc}		۱/۷۵±۰/۰۵^{b}	۳۳/۴۰±۹/۲۱^{c}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۷۸/۹۳±۷/۸۲^{a}	۷۵/۷۰±۲/۵۷^{abc}	۷۴/۶۱±۴/۹۳^{bc}	۹۵±۰/۱۴^{b}	۱/۷۳±+۰/۰۴^{ab}	۳۲/۱۴±۱/۸۸^{c}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۷۱/۸۵±۴/۰۴^{a}	۶۴/۳۷±۱/۸۸^{a}	۵۸/۳۹±۱/۸۵^{a}	۷۴±۰/۰۸^{a}	۱/۶۷±۰/۰۱^{a}	۲۴/۳۱±۰/۷۷^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{a}	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{a}	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{c}		۱/۷۰±۰/۰۴^{ab}	۳۳/۲۴±۱/۱۸^{c}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین و چالش داده شده با VP	۷۴/۳۲±۳/۱۸^{a}	۷۴/۳۲±۳/۱۸^{abc}	۷۳/۲۳±۳/۱۸^{bc}	۸۸±۰/۰۸^{ab}	۱/۷۳±+۰/۰۱^{ab}	۳۱/۵۷±۱/۶۱^{b}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و لاکتوفرین و چالش داده شده با VC	۷۶/۴۶±۹/۸۸^{a}	۷۱/۸۵±۴/۰۴^{ab}	۶۷/۳۵±۳/۳۲^{ab}	۸۰±۰/۰۵^{ab}	۱/۶۶±۰/۰۳^{a}	۲۸/۳۲±۰/۸۱^{b}

-حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف در بالای اعداد نشانه تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد است (p<۰/۰۵).

جدول ۴- درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی برحسب میلی‌متر، زیست توده کل تولید شده بر حسب میلی متر بر فالکون آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده و یا به همراه نایسین بعد از پنج روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolitycus* چالش داده شده است (آزمایش ۱).

تیمار	بقاروزانه(٪)			درصد نسبی بقا (٪)	طول فردی (میلی‌متر)	زیست توده کل تولید شده
	روز چهارم	روز پنجم	روزششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۷۷/۴۶±۱/۶۶^{a}	۶۹/۵۴±۹/۶۸^{ab}	۶۹/۵۴±۹/۶۸^{cd}		۱/۶۳±۰/۰۸^{c}	۲۸/۱۳±۳/۸۴^{d}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۷۶/۴۶±۹/۸۸^{a}	۶۹/۳۸±۲/۵۱^{ab}	۶۵/۴۱±۳/۶۰^{bc}	۹۵±۰/۰۹^{b}	۱/۷۵±+۰/۱۱^{bc}	۲۸/۸۳±۰/۳۴^{bc}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۷۰/۱۶±۱/۳۵^{a}	۵۲/۳۱±۵/۰۸^{a}	۳۱/۳۳±۶/۴۱^{a}	۴۵±۰/۰۶^{a}	۱/۵۶±۰/۰۹^{ab}	۸/۵۶±۲/۸۶^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3 و نایسین	۸۶/۷۶±۶/۴۶^{a}	۸۱/۰۷±+۱/۱۰^{b}	۷۹/۶۹±۱/۲۰^{d}		۱/۹۶±۰/۱۹^{ab}	۳۶/۹۸±۶/۰۱^{d}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و نایسین و چالش داده شده با VP	۷۶/۱۷±۹/۲۱^{a}	۷۶/۱۷±۹/۲۱^{b}	۷۶/۱۷±۹/۲۱^{bcd}	۹۸±۰/۲۵^{b}	۱/۹۹±۰/۱۱^{bc}	۳۷/۰۲±۴/۰۰^{cd}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و نایسین و چالش داده شده با VC	۷۷/۸۴±۹/۳۴^{a}	۶۵/۵۵±۴/۹۷^{ab}	۴۷/۲۴±۹/۳۳^{ab}	۶۰±۰/۱۳^{a}	۱/۶۰±۰/۱۳^{a}	۱۷/۴۸±۶/۲۱^{b}

-حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف در بالای اعداد نشانه تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد است (p<۰/۰۵).

جدول ۵- آزمایش ۲ : درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی، میانگین طول فردی برحسب میلی‌متر، زیست توده کل تولید شده بر حسب میلی متر بر فالکون آرتمیای تغذیه شده با LVS3 کشته شده و یا به همراه زایموزان بعد از پنج روز که در روز سوم با باکتری‌های *V. campbellii* و *V. proteolitycus* چالش داده شده است.

تیمار	بقاروزانه (٪)			درصد نسبی بقا (٪)	طول فردی (میلی‌متر)	زیست توده کل تولید شده
	روز چهارم	روز پنجم	روزششم			
۱) تیمار تغذیه شده با LVS3	۸۵/۳۹±۹/۲۱^{a}	۸۵/۳۵±۹/۲۱^{b}	۸۵/۳۹±۹/۲۱^{c}		۱/۷۵۳±۰/۰۵^{a}	۳۴/۲۴±۱/۳۳^{b}
۲) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VP	۷۷/۶۶±۱/۴۳^{a}	۷۴/۴۳±۱/۱۸^{abc}	۷۳/۵۷±۱/۲۹^{bc}	۸۸±۰/۲۶^{b}	۱/۷۳±+۰/۰۴^{ab}	۳۰/۷۷±۳/۲۰^{b}
۳) تیمار تغذیه شده با LVS3 و چالش داده شده با VC	۷۰/۹۱±۵/۶۲^{a}	۶۳/۰۴±۷/۲۹^{a}	۵۴/۴۹±۱/۵۳^{a}	۶۴±۰/۰۷^{a}	۱/۶۷±۰/۰۱^{a}	۲۲/۲۲±۰/۸۸^{a}
۴) تیمار تغذیه شده با LVS3	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{b}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{c}		۱/۷۳±۰/۰۱^{b}	۳۴/۷۵±۰/۳۰^{b}
۵) تیمار تغذیه شده با LVS3 و نایسین و چالش داده شده با VP	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{a}	۸۳/۵۳±۷/۴۵^{bc}	۷۸/۹۳±۷/۸۲^{c}	۸۷±۰/۰۸^{b}	۱/۷۲±+۰/۰۵^{b}	۳۲/۸۰±۲/۳۶^{b}
۶) تیمار تغذیه شده با LVS3 و نایسین و چالش داده شده با VC	۷۰/۶۲±۹/۵۸^{a}	۶۵/۰۷±۸/۴۷^{ab}	۵۹/۰۵±۹/۷۹^{ab}	۶۵±۰/۱۰^{a}	۱/۶۸±۰/۰۳^{a}	۲۴/۳۷±۴/۵۸^{a}

-حروف لاتین غیر مشترک در هر ردیف در بالای اعداد نشانه تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد است (p<۰/۰۵).

۳.۴. درصد بازماندگی روزانه

در هر دو تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii* درصد بازماندگی در روز چهارم، پنجم و ششم درصد بازماندگی در آرتمیاهای که با LVS3 کشته شده و نایسین (تیمار نایسین) تغذیه شده بودند نسبت به آرتمیاهایی که فقط با LVS3 کشته شده (تیمار شاهد) تغذیه شده بودند بالاتر بود اما اختلاف معنی داری نداشتند ($P > 0.05$). همچنین با افزایش زمان رویارویی با باکتری بیماری‌زا (روز چهارم تا ششم) در صد بازماندگی کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

۳.۵. درصد نسبی بازماندگی در روز ششم

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* ، درصد نسبی بازماندگی در تیمار نایسین نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$). در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، در صد نسبی بازماندگی در تیمار نایسین نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). درصد نسبی بازماندگی در تیمار شاهد و نایسین بین آرتمیاهای چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii* تفاوت معنی دار ایجاد کرده بود و درصد نسبی بازماندگی در آرتمیاهای چالش داده شده با *V. campbellii* پایین‌تر بود ($p<۰/۰۵$).

۳.۶. طول فردی آرتمیا (میلی متر)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus* و *V. campbellii* طول فردی آرتمیا در تیمار نایسین نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

۳.۷. زیست توده کل تولید شده (میلی متر بر فالکون)

در تیمار چالش داده شده با *V. proteolitycus*، زیست توده کل تولید شده در تیمار نایسین نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<۰/۰۵$). در تیمار چالش داده شده با *V. campbellii*، زیست توده کل تولید شده در تیمار لاکتوفرین نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($p<۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

احتمالاً سیستم ایمنی ذاتی بی‌مهرگان طیف گسترده و متنوعی از عوامل بیماری‌زا را به وسیله‌ی الگوهای مولکولی رایج مثل لیپوپلی‌ساکارید یا پپتیدوگلیکان باکتری‌ها یا بتاگلوکان باکتری‌ها و قارچ‌ها تشخیص می‌دهد (Fuha and Jianhai, 2013). محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی اند که با افزایش عملکرد سلول‌های فاگوسیتیک و با تولید آنتی بادی موجب تحریک پاسخ ایمنی می گردند. درحقیقت این مواد گلبول‌های سفید را فعال می کنند. چنین موادی نه تنها مقاومت موجود را نسبت به بیماری‌های عفونی بیشتر می کنند، بلکه خطر شیوع بیماری را کم می کنند (Sakai, 1998).

نتایج کلی مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که لاکتوفرین و نایسین به عنوان محرک ایمنی باعث افزایش عملکرد آرتمیا (درصد بازماندگی روزانه، درصد نسبی بازماندگی و زیست توده کل تولید شده) در برابر پاتوژن *Vibrio campbellii* (VC) و *Vibrio proteolitycus* (VP) می‌شوند. همچنین لاکتوفرین و نایسین هردو باعث افزایش معنی دار در زیست توده کل تولید شده اند. بر اساس یافته‌ها، اضافه کردن مقدار مشخص از لاکتوفرین و نایسین به صورت روزانه به آرتمیا مقاومت این موجود را در برابر پاتوژن‌ها افزایش می دهد در حالی که آرتمیاهایی که فقط از LVS3 مرده تغذیه شده بودند در برابر این پاتوژن‌ها مقاومت لازم را نداشتند. نتایج این مطالعه تاییدی بر نتایج Soltanian و همکاران (۲۰۰۷a) است که پتانسیل حفاظتی مجموعه ای از محرک‌های ایمنی شامل شش بتا گلوکان تجاری و ذرات کیتین را در چالش ناپلی آرتمیا با پاتوژن ویبریو کمپلی تحت شرایط گنوتوبیوتیک بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بتا گلوکان باعث بقای قابل توجهی در آرتمیا می شود.

همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که اگر چه مقدار مورد استفاده در این آزمایش باعث افزایش مقاومت آرتمیا در برابر ویبریوها خواهد شد اما یافتن مقدار بهینه برای محافظت کامل در برابر ویبریوها باید مشخص شود، چنان که مطالعه Soltanian و همکاران (۲۰۰۷b) نشان داد که انواع مختلف مخمر با داشتن مقادیر متفاوتی از گلوکاگان می توانند آرتمیا را به طور کامل در برابر ویبریو محافظت کنند و یا مانند این آزمایش باعث بهبود عملکرد آرتمیا شوند. احتمالاً مقدار بالاتر و یا در دسترس بودن بهتر محرک‌های ایمنی مثل بتوگلوکان و کیتین و محرک ایمنی مورد استفاده در این آزمایش (لاکتوفرین و نایسین) ممکن است نقش اساسی در محافظت از آرتمیا در برابر ویبریوها داشته باشند.

بررسی نتایج مطالعه فعلی و مطالعه Marques و همکاران (۲۰۰۶b) که پتانسیل اثر دو سویه مختلف باکتری پروبیوتیک را در شرایط گنوتوبیوتیک و آزمون چالش با ویبریوی بیماری زای کمپلی و یا با گونه ی ویبریوی فرصت طلب پروتئولیتیکوس بررسی کردند، نشان داد که استفاده از روش‌های پیشگیرانه جدید مانند محرک‌های ایمنی و باکتری‌های پروبیوتیک برای کاهش استرس و مرگ و برای تحریک مکانیسم دفاعی غیر اختصاصی در آبزی پروری در حال افزایش است و نتایج این آزمایش‌ها این روش‌ها را تایید می کند. هر دو گونه باکتری استفاده شده در آزمایش Marques و همکاران (۲۰۰۶b) و لاکتوفرین و نایسین استفاده شده در این آزمایش توانستند آرتمیا را در برابر ویبریوی فرصت طلب پروتئولیتیکوس محافظت کنند.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که لاکتوفرین و نایسین باعث عملکرد بهتر درصد بقای روزانه، درصد نسبی بقای آرتمیا در برابر *V. campbellii* و *V. proteolitycus* می شوند اما تاثیر اصلی لاکتوفرین و نایسین بر بهبود زیست توده کل تولید شده (TBP) است که دلیل اصلی آن بازماندگی و بقا آرتمیا ست. اگر چه در نتایج تفاوت معنی دری ایجاد نکرده بود اما این افزایش باعث تفاوت معنی دار در زیست توده کل شد. به همین علت می توان تایید کرد که لاکتوفرین یکی از مؤلفه‌های مهم سیستم ایمنی غیر اختصاصی است که نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری شامل تنظیم متابولیسم آهن (Suzuki *et al*., 2001; Ward and Conneely, 2004)، حفاظت در مقابل عفونت‌های باکتریایی (Shan *et al*., 2007)، تنظیم عملکرد ایمنی (Esteban *et al*., 2005; Chand *et al*., 2006)، تحریک پاسخ های ایمنی غیر اختصاصی (Kamilya *et al*., 2006)، تنظیم پاسخ‌های التهابی (Hayashida *et al*., 2004)، فعالیت آنتی اکسیدانی، خاصیت اتصال به سموم، فعالیت ضدویروسی و فعالیت ضدقارچی را می توان به آن نسبت داد.

نایسین نیز باعث عملکرد بهتر (درصد بقای روزانه، درصد نسبی بقا و بیومس کل تولید شده) آرتمیا در برابر *V. campbellii* و *V. proteolitycus* شد که این افزایش مقاومت می تواند تحت تاثیر مکانیسم عمل نایسین باشد، زیرا غشای سیتوپلاسمی هدف اصلی برای عمل نایسین است که عملکرد آن با ایجاد روزنه برای نفوذ در این غشا ست. نایسین ها از طریق برهم‌کنش با ترکیبات فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی توسط پیوندهای یونی عمل می‌کنند. حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل نایسین محدود است که ناشی از دیواره سلولی غیر نفوذپذیر نسبت به آن است. در جمع بندی، این اولین بار است که ذرات محرک ایمنی (نایسین، لاکتوفرین) در یک تست چالش استاندارد مورد آزمایش قرار گرفت. در واقع به دلیل شرایط گنوتوبیوتیک، این سیستم می‌تواند به عنوان یک ابزار منحصر به فرد برای تفریق بین اثرات تغذیه‌ای و خواص واقعی تحریک کنندگی سیستم ایمنی ناشی از کاربرد یک محصول خاص استفاده شود.

نتیجه گیری نهایی

با استفاده از سیستم گنوتوبیوتیک و تکمیل آن با ابزارهای دیگری مانند اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی و تجزیه و تحلیل بیان ژن می‌توان اسناد بیشتری در مورد تاثیر دقیق محرک های ایمنی بر فاکتور های 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 و می‌توان با آزمایش‌های دیگر روی نایسین و لاکتوفرین در سیستم گنوتوبیوتیک و تغییر غلظت مورد استفاده به مقدار بهینه برای تاثیر بیشتر در مقابل باکتری‌های بیماری زا رسید.

تشکر و قدردانی

از همکاری و حمایت کارشناسان آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز سپاسگزاری می گردد.

۵. منابع

References

Agh, N., Sorgeloos, P., 2005. Handbook of Protocols and Guidelines for Culture and Enrichment of Live Food for Use in Larviculture. Published by: Artemia & Aquatic Animals Research Center Urmia University Urmia – Iran, p.60.

Ainsworth, A.J., Dexiang, C., 1990. Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. *Developmental & Comparative Immunology* 14(2), 201-209.

Bossier, P., Xiaomei, W., Catania, F., Dooms, S., Van Stappen, G., Naessens, E., Sorgeloos, P., 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (International Study on Artemia LXX). *Aquaculture* 231(1-4), 93-112.

Chand, R.K., Sahoo, P.K., Kumari, J., Pillai, B.R., Mishra, B.K., 2006. Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress. *Fish & shellfish immunology* 21(2), 119-129.

Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., Lamas, J., 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* 219(1), 99-109.

Esteban, M.A., Rodríguez, A., Cuesta, A., Meseguer, J., 2005. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Fish & shellfish immunology* 18(2), 109-124.

Fuha, L., Jianhai, X., 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology* 39, 11-26.

Gonzalez-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents* 33(4), 301-308.

Hayashida, K., Kaneko, T., Takeuchi, T., Shimizu H., Ando, K., Harada, E., 2004. Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. *Journal of veterinary medical science* 66(2), 149-154.

Jorgensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B., 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 16(4), 313-325.

Kamilya, D., Ghosh, D., Bandyopadhyay, S., Mal, B.C., Maiti, T.K., 2006. In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. *Aquaculture* 253(1), 130-139.

Kwak, J.K., Park, S.W., Koo, J.G., Cho, M.G., Buchholz, R., Goetz, P., 2003. Enhancement of the Non-Specific Defence Activities in Carp (*Cyprinus carpio*) and Flounder (Paralichthys olivcaces) by Oral Administration of Schizophyllan. *Acta biotechnologica* 23(4), 359-371.

Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2005. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of experimental marine biology and ecology* 312(1), 115-136.

Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2005. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host–microbe interactions. *Journal of applied microbiology* 100(5), 903-909.

Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006. Immunostimulatory nature of b-glucans and bakers yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish & shellfish immunology* 20, 682-692.

Marques, A., Huynh Thanh, T., Verstraete, W., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006. Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334, 20-30.

Sakai, M., 1998. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.

Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M., 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 12(2), 172-201.

Shan, T., Wang, Y., Liu, J., Xu, Z., 2007. Effect of dietary lactoferrin on the immune functions and serum iron level of weanling piglets. *Journal of animal science* 85(9), 2140-2146.

Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish Immunology* 15(1), 71-90.

Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007 a. Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown Artemia. *Fish & shellfish immunology* 23(1), 141-153.

Soltanian, S., Thai, T.Q., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007 b. The protective effect against *Vibrio campbellii* in Artemia nauplii by pure β-glucan and isogenic yeast cells differing in β-glucan and chitin content operated with a source-dependent time lag. *Fish & shellfish immunology* 23(5), 1003-1014.

Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp Artemia in Aquaculture. Artemia Reference Center, Faculty of Agriculture, State University of Ghent, Belgium, p. 318.

Steijns, J. M., 2004. Technological properties and application of lactoferrin. IFT Annual Meeting, July 12-16.

Suzuki, Y.A., Shin, K., Lönnerdal, B., 2001. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry* 40(51), 15771-15779.

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

Van Stappen, G., 1996. Introduction, biology and ecology of Artemia. *Manual on the production and use of live food for aquaculture 361*, 79-106.

Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000 b. Selected Bacterial Strains ProtectArtemia spp. from the Pathogenic Effects of Vibrio proteolyticus CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3), 1139-1146.

Ward, P.P., Conneely, O.M., 2004. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* 17(3), 203-208.