View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران ـ پژوهشکده میگوی کشور

عنوان :

بررسی تأثیرات استفاده از بتاگلوکان و عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* و *Padina boergesni* در پیشگیری از بیماری لکه سفید میگوی سفید هندی (WSD)

مجری :
بابک قائدنیا

شماره ثبت
۸۸/۵

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران- پژوهشکده میگوی کشور

- عنوان پروژه/ بررسی تأثیرات استفاده از بتاگلوکان و عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* و *Padina boergesni* در پیشگیری از بیماری لکه سفید (WSD) میگوی سفید هندی
- شماره مصوب:۸۶۰۰۹-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۷-۲
- نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان:بابک قائدنیا
- نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):-
- نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان: بابک قائدنیا
- نام‌ونام‌خانوادگی همکاران: عقیل دشتیان نسب- مریم میربخش- وحید یگانه- مختارحق‌نجات- محمد خلیل‌پذیر- محمد افشارنسب- محمدرضا مهرابی
- نام‌ونام‌خانوادگی مشاور (ان): -
- محل اجرا: استان بوشهر
- تاریخ شروع:۱۳۸۵/۷/۱
- مدت اجرا:۱ سال
- ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
- شمارگان(تیتراژ):۱۵ نسخه
- تاریخ انتشار:سال ۱۳۸۸
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Iran Shrimp Research Center

Title:

Study on effects of Beta-glucan & extraction of *Sargassum* & *Padina* algae in prevention and treatment of WSD in *Fenneropenaeus indicus*

Executor :

Babak Ghaednia

Registration Number

2009.5

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Iran Shrimp Research Center

---

Title : Study on effects of Beta-glucan & extraction of *Sargassum & Padina* algae in prevention and treatment of WSD in *Fenneropenaeus indicus*
Apprpved Number: 2-027-200000-05-0000-86009
Author: Babak Ghaednia
Executor *:* Babak Ghaednia
Collaborator *:* A. Dashtiannasab; M. Mirbakhash; V. Yeganeh; M. Haghnejat; M. Kh. Pazir; M. Afsharnasab; M.R. Mehrabi
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2007
Period of execution : *1 year*
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***15***
Date of publishing : ***2009***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

بسمه تعالی

طرح / پروژه : بررسی تأثیرات استفاده از بتاگلوکان و عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* و *Padina boergesni* در پیشگیری از بیماری لکه سفید (WSD) میگوی سفید هندی

کد مصوب: ۸۶۰۰۹-۰۰۰۰-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۷-۲

با مسئولیت اجرایی : بابک قائدنیا [۱]

در تاریخ ۱۳۸۷/۹/۱۸ در کمیته علمی فنی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران مورد تأیید قرار گرفت.

معاون تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران

---

[۱]- آقای بابک قائدنیا متولد سال ۱۳۵۳ در شهرستان تهران بوده و دارای مدرک تحصیلی فوق لیسانس در رشته قارچ شناسی می‌باشد و در زمان اجرای پروژه / طرح : بررسی تأثیرات استفاده از بتاگلوکان و عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* و *Padina boergesni* در پیشگیری از بیماری لکه سفید (WSD) میگوی سفید هندی

در ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت کارشناس ارشد بخش بهداشت و بیماریها مشغول فعالیت بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

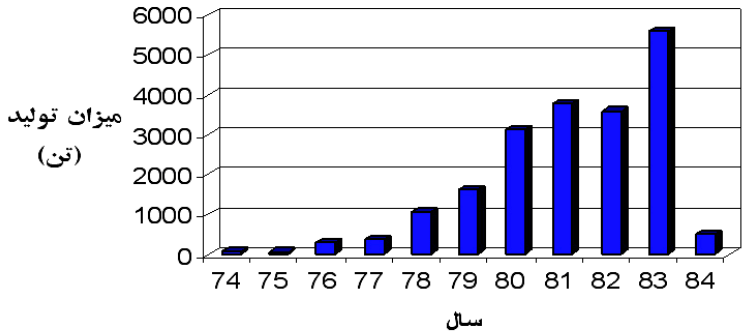
چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- کلیاتی در خصوص سیستم ایمنی سخت پوستان ۳
۱-۲- مروری بر منابع ۱۰
۲- مواد و روشها ۱۳
۲-۱- بررسی تأثیر عصاره آب گرم جلبک‌هایS.glaucescens و P.boergeseni ۱۳
۲-۲- بررسی تأثیر بتا ۱ و ۱۳ و۶ خوراکی ۲۱
۳- نتایج ۲۳
۳-۱- تأثیر غوطه وری در غلظتهای مختلف عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*
بر شاخص های ایمنی و بازماندگی میگوهای سفید ۲۳
۳-۲- تأثیر غوطه وری در غلظتهای مختلف عصاره آب گرم جلبک*P.boergeseni*
بر شاخص های ایمنی و بازماندگی میگوهای سفید هندی ۲۷
۳-۳- تاثیر تغدیه با غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر شاخص های ایمنی
و بازماندگی میگوهای سفید هندی ۳۲
۴- بحث و نتیجه گیری ۳۷
پیشنهادها ۴۳
منابع ۴۷
چکیده انگلیسی ۵۱

چکیده

در این مطالعه دو گونه جلبک قهوه ای *Sargassum glaucescens* و *Padina boergeseni* که در خلیج فارس و سواحل استان بوشهر به وفور یافت می شوند، جمع آوری شده و پس از عصاره گیری با آب گرم، اقدام به لئوفلیزه کردن عصاره حاصل گردید. برای بررسی تأثیر هر یک از غلظتهای جلبکهای نامبرده بر میگوهای سفید هندی(۱/۲۰±۱۱/۳۲ گرمی)، پس از استرس زدایی در ایستگاه تحقیقاتی شغاب، در آب دریای (با شوری ppt ۳۹ و دمای $^{\circ}C$ ۱± ۲۵) حاوی غلظت های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره هر یک از جلبکها ، غوطه ور شدند و میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی (تعداد هموسیت کل(THC)، میزان پروتئین پلاسمای کل(TPP)، فعالیت فاگوسیتی، فعالیت باکتری کُشی و توانایی پاکسازی باکتریایی) میگوهای سفید هندی، مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این استفاده خوراکی از بتا۱و۳ ۱و۶ گلوکان با تیمارهای ۲، ۱۰ و ۲۰ گرم بر کیلوگرم غذای کنسانتره، بر سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید ویروسی بر روی میگوهای سفید هندی بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غوطه ور ساختن میگوهای سفید هندی در ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* و *P.boergeseni* به مدت ۲ الی ۳ ساعت، یا تغذیه کردن میگوها با جیره غذایی حاوی ۱۰ گرم بر کیلوگرم بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان به مدت ۱۴ روز، در افزایش THC، TPP، فعالیت فاگوسیتوزی، فعالیت باکتری کشی و توانایی حذف باکتریای مؤثر می باشد. علاوه بر این غوطه وری به مدت ۳ ساعت در آب دریای حاوی ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر از عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* ،پیش از مواجهه با ویروس لکه سفید، در افزایش میزان بازماندگی میگوهای سفید هندی موثر بود.

۱- مقدمه

همانطوری که از نمودار شماره ۱ استنباط می شود، میزان برداشت میگوی پرورشی استان بوشهراز سال ۱۳۷۴ لغایت ۱۳۸۳ از رشد مناسبی برخوردار بوده است، بطوری که در سال ۱۳۸۳ به ۵۶۰۰ تن رسید. میانگین وزنی اعلام شده تقریبا ۱۷ الی ۱۸ گرم بوده است که ارزش اقتصادی آن بالغ بر ۱۶۰ هزار میلیارد ریال می باشد، ولی در سال ۱۳۸۴ بدلیل بروز و شیوع بیماری لکه سفید (WSD) به حدود ۵۰۰ تن رسیده است و ارزش اقتصادی آن به حدود ۹۰ میلیارد ریال کاهش یافت.



نمودار شماره ۱- میزان تولید میگوی پرورشی استان بوشهر از ابتدا تا بروز بیماری لکه سفید در سال ۱۳۸۳.

این آمار ضرورت توجه بیشتر به بیماریها و انجام طرح های تحقیقاتی در این زمینه را توجیه می نماید. هم اکنون تمامی بررسیهای انجام گرفته درزمینه بیماری لکه سفید، لزوم بکارگیری ابزارهای مدیریتی پیشگیرانه را برای کنترل آن و سایر بیماریها خاطرنشان می سازد. مدیریت بیماری، معضل عمده برسرراه پایداری صنعت تکثیر و پرورش میگو است. اگربناست صنعت پرورش میگو به رشد وپویائی خود ادامه دهد باید برای کنترل بیماریها، جایگاه ویژه ای قائل بود. راهبردهای مدیریتی کارآمد ونوآور و پرورش با تمهید ابزارهای خاص مدیریتی، نقش بسیارمهّمی را در حصول این مهم ایفا می نماید.

شکی نیست که بیماری، مشکل درجه یک و تأثیر گذار بر حیات اقتصادی وپایداری دراز مدت صنعت پرورش میگو است. این صنعت دراین زمینه با دیگرفعالیتهای کشاورزی تفاوتی ندارد. از دیدگاه مدیریتی، همواره پیشگیری از بیماریها، بهتر از تلاش برای مبارزه ودرمان آنها پس از وقوع است . اغلب قصور در انجام پیشگیریهای ساده برای جلوگیری از عوامل بیماریزا، سبب بروز فجایع ومشکلات لاینحـــل می شود. مثالِ این

مورد در پرورش میگو، ویروس لکه سفید (WSV) است. چنین فرض می شود که گسترش این ویروس در صنعت پرورش میگو در جنوب شرق آسیا، از طریق جابجائی میگوهای آلوده در آن منطقه صورت گرفته است. با نگاهی به گذشته می توان به این نتیجه رسید که انتشار سریع ویرورس لکه سفید در آمریکای لاتین نیز به همین دلیل یعنی انتقال کنترل نشده میگوهایِ آلوده از طریق بنگاههای اقتصادی صورت گرفته است بنابراین مبارزه دقیق و کارآمد با عوامل بیماریزای میگوهای پرورشی، منوط به شناسایی هرچه بیشترِ برهمکنشِ بین عوامل بیماریزا و سیستم ایمنی میگوها می باشد.

یکی از ترکیباتی که بدلیل خاصیتِ ضد ویروسی آن برای پیشگیری از بروز بیماریهای ویروسی بکار می رود، ترکیبات پلی ساکاریدی سولفاته است که می توان این ترکیب را از جلبکهای قهوه سواحل خلیج فارس به آسانی جدا سازی کرد.

با توجه به میزان برداشت میگوهای پرورشی در ایران و بویژه در استان بوشهر که نزدیک به ۶۰ درصد ازمیزان تولید میگوهای پرورشی کل کشور را شامل می شود و با توجه به اشتغال زایی این صنعت و همچنین چشم انداز سال های آتی، در مورد تأمین منابع غذایی، بررسی راهکارهایی برای بهداشت و بهبود شرایط تکثیر و پرورش میگوهای پرورشی ضروری می نماید، چرا که عوامل پاتوژن موجود در پیرامون میگوهای پرورشی، بعنوان یک استرس مهم محسوب می شود. در این طرح تلاش بر این است که با بهبود کارایی سیستم ایمنی، میگوها را در برخورد با این عوامل نامطلوب یاری نموده وتأثیر استرسهای گوناگون کاهش یابد.

۱-۱-کلیاتی در خصوص سیستم ایمنی سخت پوستان

در ابتدا بمنظور یادآوری مطالعات انجام شده در خصوص سیستم ایمنی سخت پوستان، مرور کوتاهی در منابع موجود ارائه می شود. اگر چه در توصیف سیستم ایمنی بی مهرگان اغلب ذکر می شود که بی مهرگان واجد سیستم ایمنی ساده تری نسبت به مهره داران می باشند ولی سیستم ایمنی آنها بسیار کارآمد و پیچیده است. بی‌مهرگان تقریباً در تمامی زیستگاههای موجود در کره زمین زندگی می کنند و این به آن معناست که آنها قادرند از عهده مبارزه و مقابله با طیف وسیعی از پاتوژنها برآیند. بقاء و تکامل بی مهره گان در طی میلیون ها سال دلیلی بر کارآیی سیستم دفاعی آنها می باشد (Millar and Ratcliffe, 1994).

طی روند تکامل، دو مکانیسم دفاعی دورنی جهت مقابله با عوامل عفونت زا شکل گرفته است که عبارتند از ایمنی ذاتی(طبیعی) و ایمنی اکتسابی (سازگار). سیستم ایمنی ذاتی را در تمامی جانورانِ پرسلولی می توان یافت این سیستم شامل عوامل سلولی (Cellular) و هومورال (Humoral) می باشد. مهمترین مکانیسم های ایمنی سلولی در مواجهه با میکروارگانیسم های مهاجم عبارتند از فاگوسیتوز، کپسوله شدن، سایتوتوکسیسیتی سلولی (Cell-Mediated Cytotoxicity) و لخته شدن (Bachère, 2000). فاکتورهای ایمنی هومورال مانند پروتئین های لخته شونده، آگلوتینین ها (مثل لکتین ها)، آنزیم های هیدرولیتیک و پپتیدهای ضد میکروبی، اغلب به همراه ایمنی سلولی تولید شده و فعالیت می نمایند. از نظر فیلوژنی، ایمنی اکتسابی جوانتر بوده و فقط در مهره داران یافت می شود و بواسطه سلولهای لنفوسیتی عمل می کند(Millar and Ratcliffe, 1994).

۱-۱-۱-مطالعه سیستم ایمنی

مطالعات بسیار وسیعی پیرامون سیستم ایمنی مهره داران صورت گرفته است که منجر به شناسایی انواع سلولهای خونی و دسته بندی های گوناگون بر اساس کارآیی های ایمونولوژیک یا مرفولوژیک شده است. علاوه بر این جداسازی، خالص سازی و شناسایی پروتئین های دفاعی، بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی را روشن ساخته است. در مقابل، تنوع بسیار زیاد بی مهرگان و دانش اندک ما در زمینه مکانیسم های دفاعی و کارایی هموسیت های آنها، موجب شده است که دسته بندی هموسیت ها بر اساس مرفولوژی آنها (به گونه ای که مؤید دانسته های ما از فیلوژنی بی مهرگان می باشد) کاری غیر ممکن بنماید. افزون بر این، هموسیت ها، سلولهای بسیار فعالی بوده و پس از خارج شدن از هموکُل (haemocoal) تغییرات قابل ملاحظه ای در آنها رخ می دهد (Bauchau, 1981)، لذا مطالعه و شناسایی این سلولها بسیار مشکل تر از بررسی عملکرد سلولهای خونی مهره داران می باشد. فعال شدن هموسیت ها موجب لخته شدن سریع، دگرانوله شدن سلولی ، فعال شدن سیستم proPo و به دنبال آن تولید مولکولهای متصل شونده می گردد(Soderhall and Jahannson, 1992). ناپایدار بودن و اندک بودن بسیاری از پروتئین های دفاعی بی مهرگان، کار جداسازی یک پروتئین خاص از سیستم دفاعی را بسیار مشکل می نماید (Soderhal *et al*, 1990).

در سال های اخیر تلاش های فراوانی جهت بکارگیری مواد ضد انعقادی و محیط های کشت نوین به منظور نگهداری هموسیت ها در حالت طبیعی صورت گرفته (Bachere, 2000) که فرصتهای بسیار مناسبی را جهت انجام مطالعات درشرایط in vitro را فراهم ساخته است. علاوه بر این، شناسایی ژنهای کُد کننده ترکیبات ایمنی و

کلون کردن آنها و سپس مطالعه بیان این ژن ها در هنگام ظهور یک عفونت یا شبیه سازی کردن یک عفونت، منجربه فهم بهتری از عملکرد سیستم دفاعی بی مهرگان شده است (Gross *et al.*, 2001).

۲-۱-۱- عملکرد سیستم دفاعی سخت پوستان

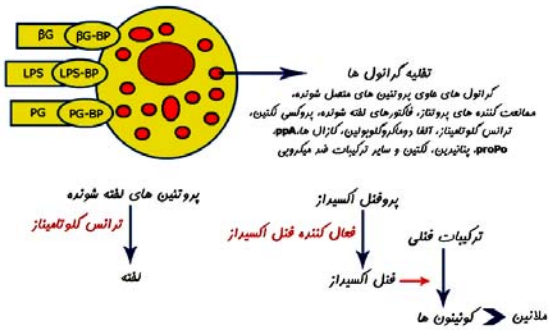
داشتن یک پوشش سخت کوتیکولی ، که گاهی حاوی ترکیبات ضد میکروبی نیز می باشد، سد فیزیکی مناسبی محسوب می گردد که می توان آن را به عنوان دفاع خارجی در سخت پوستان در نظر گرفت. هموسیت ها نقش بسیار مهم و کلیدی در دفاع درون بافتی ایفا می کنند. اگر چه سه گروه مختلف سلولی به طور کلی توصیف شده است ولی تا کنون طبقه بندی جامعی برای هموسیت های میگوهای پنائیده در دسترس نبوده و حتی در مقلات سالهای اخیر نیز تفاوتهایی در این دسته بندی ها و بیان نتایج مشاهده می شود و بطور کلی می توان این سه گروه سلولی عبارتند از(Bauchau, 1981):

۱- سلولهای شفاف (هیالین)، که کوچکترین سلولها بوده و نسبت هسته به سیتوپلاسم در آنها بالاست و گاهی تعداد اندکی گرانول های سیتوپلاسمی در آنها دیده می شود.

۲- سلولهای دانه دار (گرانولار)، که بزرگترین سلولها بوده و هسته آنها کوچکتر از سلولهای شفاف می باشد، و سیتوپلاسم آنها مملو از گرانول است.

۳- سلولهای نیمه دانه دار (سمی گرانولار)، که از نظر اندازه، بین سلولهای شفاف و گرانولار می باشند.

چشم اندازی شماتیک از مهمترین فاکتورهای مربوط به سیستم دفاعی سخت پوستان که تاکنون شناخته شده در شکل ۱ ارائه شده است.



تصویر ۱- تصویر شماتیک از عملکرد چند فاکتور مهم مربوط به سیستم دفاعی سخت پوستان

اولین و ضروری ترین فرآیند دفاع درونی، شناسایی میکروارگانیسم های مهاجم می باشد که که توسط هموسیت ها و پروتئین های پلاسما انجام می شود (Vargas- Albores and Yepiz – Plascencia-2000)، فرض بر این است که سیستم ایمنی بی مهرگان، الگوهای مولکولی ثابت متعلق به طیف وسیعی از پاتوژن ها را شناسایی می‌کند. چندین نوع از پروتئین هایِ شناسایی، تعریف شده اند که بنام پروتیئن های شناسایی الگو (PRPs)نامیده می‌شوند. پروتیئن های PRP قادرند بخشهای کوچکی از هیدراتهای کربن موجود در ترکیبات دیواره سلولی میکروارگانیسم را مانند لیپوپلی ساکاریدها (LPS) یا پپتیدوگلیکان های (PG)باکتریایی یا β ۱و۳ گلوکان قارچی را شناسایی نمایند (Söderhäll *et al*. 1996, Vargas- Albores *et al.*, 1997) . برخی از PRP ها جزء لکتین ها محسوب می شوند و می توانند مستقیماً به عنوان آگلوتنین یا اپسونین عمل نمایند(Söderhäll *et al.*, 1996 and Kopácek *et al.*, 1993). پس از اتصال PRPبه ترکیبات میکروبی، جایگاه ثانویه ای جهت اتصال سلولی فعال می شود. فعال شدن هموسیت ها پس از مرحله اتصال ثانویه، اتفاق می افتد(Vargas- Albores and Yepiz Yepiz – Plascencia-2000) (تصویر ۱).

پروتئین های دفاعی که تاکنون از میگوهای خانواده پنائیده جدا سازی و شناسایی شده اند عبارتند از (Vargas- Albores and Yepiz – Plascencia-2000) :

۱- پروتئین متصل شونده به β-۱و۳ گلوکان.

۲- پروکسی نکتین (Proxinectin).

۳- بازدارنده کازال (Kazal inhibitor).

۴- ترانس گلوتامیناز

۵- پروتیئن لخته شونده

۶- proPo

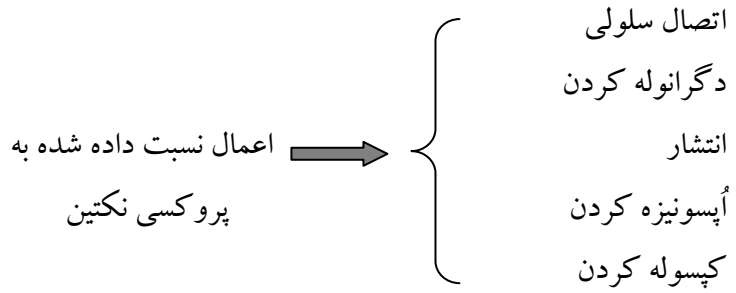
پس از شناسایی مواد بیگانه، بواسطه فرآیند کیموتاکتیک، هموسیت ها به محلی که تهاجم اتفاق افتاده است مهاجرت می کنند که این امر باعث بروز التهاب می گردد و شبیه به فرآیندی است که در مهره داران دیده می شود. باز بودن سیستم چرخش خون، سیستم دفاعی سریع و کارآمدی را طلب می نماید که واکنش های زنجیره ای فاگوسیتی نقش مهمی را دراین زمینه ایفا می کنند (Srylunyalucksana and Söderhäll, 2000). هموسیت ها مسئول سنتز، ذخیره سازی و ترشح (به محض فعال شدن) مواد اولیه و پیش سازهای آنزیمی جهت

لخته شدن و واکنش های زنجیره ای proPo می باشند. فرآیند لخته شدن، ترکیبات بیگانه را به دام انداخته و از سردرگمی هموسیت ها جلوگیری می نماید. واکنش لخته شدن وابسته به ترانس گلوتامیناز در سخت پوستان، در خرچنگ آب شیرین *(Pacifastacus leniusculus)* شناسایی شده است(Kopácek *et al*., 1993 and Hall *et al*., 1999). هنگامی که ترانس گلوتامیناز (T Gase) از هموسیت ها یا بافت ها رها سازی می شود(تصویر ۱)، واکنش لخته شدن تحریک می گردد. با حضور یون کلسیم (Ca^{2t}) و عمل کاتالیزوری TGase، پلی مریزاسیون پروتئین لخته شونده در پلاسما شکل گرفته و ترکیبی ژل مانند تشکیل می شود(Kopácek *et al*., 1993 and Yeh *et al*., 1998).

سیستم فعال کننده proPO در سخت پوستان نیز به طور بسیار وسیعی در خرچنگ آب شیرین *(P. leniusculus)* مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین های سیستم proPO نقش بسیار برجسته ای در شناسایی غیرخودی، ارتباط بین هموسیت ها و تولید ملانین ایفا می نمایند. به محض فعال شدن و دگرانوله شدن هموسیت ها، proPOی غیر فعال تحت تاثیر آنزیم فعال کنده پروفنل اکسیدار (PPA) فعال شده و آنزیم PO موجب کاتالیز شدن اکسیداسیون گام به گام فنل و تبدیل آن به کوئینون ها می گردد(تصویر ۱). ادامه یافتن واکنش و طی شدن مراحل واسطه، منجر به تولید ملانین می گردد.

در خلال این فرآیندها، فاکتورهای ضدمیکروبی نیز تشکیل می شوند .(Söderhäll *et al.* 1996; Söderhäll and Cerenius, 1998) ملانین رنگدانه ای به رنگ قهوه ای تیره می باشد که با محاصره کردن عوامل بیماریزا از تماس آنها با میزبان جلوگیری می نماید. مکانهای ملانیزه را می توان اغلب بر روی سطح یا در زیر کوتیکول آرتروپودها مشاهده کرد.

فاکتور مهم دیگری که در سیستم Po شرکت می کند، پرکسی نکتین (Proxinectin) می باشد. این ترکیب دو عملکرد متفاوت شامل اتصال سلولی و فعالیت پراکسیدازی دارد. پروکسی نکتینِ مربوط به سخت پوستان در هموسیت ها سنتز می شود ودر شرایطی که هموسیت ها به صورت غیر فعال می باشند در گرانول ها ذخیره می گردد. در صورت تحریک شدن هموسیت ها، پروکسی نکتین آزاد شده و در خارج سلول فعال می گردد. گیرنده های غشایی موجود بر روی هموسیت ها نقش بسیار مهمی را در عملکرد اتصال سلولی پرکسی نکتین بازی می نماید (Johannson, 1999). اتصال سلولی موجب اتصال، فاگوسیتوز ، کپسوله شدن، تشکیل ندول و آگلوتیناسیون می گردد و در کنار خاصیت پراکسیدازی، موجب کشتن میکروارگانیسم مهاجم می گردد (تصویر ۱ و نمودار شماره ۲).



نمودار شماره۲- فعالیت های منسوب به پروکسی نکتسن در سخت پوستان

فاگوسیتوز عبارت است از بلعیده شدن ذرات بیگانه کوچک توسط سلولهای خاص. در هموسیت های میگو نیز مانند سلولهای خونی مهره داران، هموسیت ها پس از بلعیدن ذرات بیگانه، با استفاده از رادیکالهای اکسیژن که خاصیت سایتوتوکسیک دارند، موجب مرگ ذرات بیگانه می شوند (Soug and Hsieh, 1994; Muvroz *et al*., 2000). اگر مقادیر فراوانی از عوامل بیگانه وارد بدن میگو شوند یا عوامل بیگانه وارد شده به اندازه ای بزرگ باشند که یک هموسیت نتواند آن را ببلعد، چندین هموسیت با یکدیگر همکاری کرده و عوامل بیماریزا را محاصره می کنند که به این دو پدیده به ترتیب تشکیل ندول و کپسوله کردن گفته می شود (Söderhäll, 1996).

یکی دیگر از محصولات هموسیت ها، باز دارندههای آنزیمهای مختلف، می باشد. این ترکیبات به منظور کنترل واکنش های زنجیره ای پروتئیناز و جلوگیری از فعالیت بیش از حد آنها و اجتناب از آسیب رساندن آنها به بافت میزبان تولید می شوند. بازدارنده های سرین پروتئیناز از خانواده Serpin و Kazal نیز در سخت پوستان شناسایی شده است (Kanost, 1999). علاوه بر این ذخیره شدن α_2 – ماکروگلوبولین که از پروتئین های متصل شونده به طیف وسیعی از پروتئازها می باشد نیز در گرانوا های هموسیت ها گزارش شده است (Armstrong and Quigley, 1999). افزون بر موارد ذکر شده، هموسیت ها نقش مهمی در تولید و آزاد سازی آگوتنینین ها، مانند لکتین ها که پپتیدهای ضد باکتریایی می باشند (Destoumieux *et al*., 1997, 2000)، ایفا می کنند (Kopácek, 1993). هموسیت ها مولکولهای سایتوتوکسیک، مانند آنزیم های لیزوزومی (لیزوزوم، استرازها، فسفاتاز، فسفولیپاز، پراکسیداز و پروتئازها)، تولید می کنند (Millar and Ratcliffe, 1994). به منظور مؤثر بودن سیستم دفاعی، تمامی ترکیبات متنوع مربوط به سیستم ایمنی باید با یکدیگر همکاری نمایند.

۳-۱-۱- کاربرد محرک های سیستم ایمنی در سخت پوستان

انتخاب یک ترکیب مناسب با خاصیت تحریک کنندگی سیستم ایمنی کاری بسیار دشوار بوده و مطالعات علمی نیز بندرت اطلاعات جامع و کاملی جهت برنامه ریزی مناسب در این خصوص در اختیار محققان قرار می دهند. بنابراین می توان چنین استدلال کرد که کلید حل این مشکل توجه کردن به دانش موجود در مورد محرک های ایمنی غیر اختصاصی است که به عنوان ادجوانت برای مهره داران عالی تر مورد بررسی می باشد یا باید به واکنشگرهایی که در شرایط آزمایشگاهی توان آنها در تحریک سیستم ایمنی اثبات شده است متوسل شد. نکته ای نیز که باید بیش از سایر موارد در نظر گرفت یک تحریک کننده مناسب باید به راحتی استفاده شود، مؤثر باشد و سمیت آن برای میزبان اندک باشد(Raa *et al*., 1992).

محرک های سیستم ایمنی را می توان به طور کلی در شش گروه دسته بندی کرد(Soderhall, and Cerenius, 1992) :

۱) باکتریهای زنده
۲) باکتریهای کشته شده (باکترین یا آنتی ژن باکتریایی)
۳) گلوکان ها
۴) پپتیدوگلیکان ها
۵) لیپوپلی ساکاریدها (LPS).
۶) ترکیبات شیمیایی

باکتریهای زنده ای که اغلب مورد استفاده قرار می گیرند گونه های ویبریو (*Vibrio sp.*) یا سایر باکتریهای بیماریزای ضعیف تر می باشند. باکتریهای کشته شده یا باکترین نیز اغلب از طریق خشک کردن در خلاء و سرمای شدید (Freeze-dry)، کشتن به کمک حرارت یا فرمالین از باکتریهایی که بیماریزاهای شناخته شده می باشند تهیه می شوند. این دو دسته به تقلید از روش های تهیه واکسن در پستانداران مورد استفاده قرار می گیرند. بر خلاف این دو گروه، پپتیدوگلیکانها، گلوکان ها و لیپوپلی ساکارید ها اغلب از دیواره سلولی باکتریها یا قارچهای غیر بیماریزا تهیه می شوند(Soderhall, and Cerenius, 1992).

به رغم برخی گزارشها، تاکنون در سیستم ایمنی سخت پوستان وجود گلوبولین یا سیستم کمپلمان تأیید نشده است و برخی از محققین نیز بر این عقیده هستند که ژنوم سخت پوستان بسیار کوچکتر از آن است که دارای

چنین پیچیدگی های ژنی باشد (Klein, 1998) به عبارت دیگرسخت پوستان فاقد ساختارهای لازم جهت ایمنی اختصاصی، ثانویه و یادآور می باشند و لذا تعریف کردن واکسن برای این جانوران کاری منطقی بنظر نمی رسد. بنابراین استفاده پیشگیرانه (پروفیلاکتیک) از محرکهای سیستم ایمنی باید به منظور فعال کردن سیستم ایمنی ذاتی (innate) باشد و از این رو فرض بر این است که محرک های سیستم ایمنی موجب تقویت و بهبود بقاء جانور و فعال کردن مکانیسم های مقابله کننده با تهدید های ناشی از ذرات غیر خودی می گردند (Raa et al., 1992).

۲-۱- مروری بر منابع

تاکنون در داخل کشور مطالعه ای در زمینه کاربرد عصاره آب گرم جلبک های قهوه ای و بررسی تاثیرات آن بر سیستم ایمنی و در پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی انجام نشده است، ولی در خارج از کشور، مطالعات فراوانی در این خصوص صورت پذیرفته است و محققین مختلف با توجه به نیازی که احساس کرده اند و با توجه به گونه جلبک و میگوی پرورشی منطقه خود مطالعاتی را طراحی و اجرا نموده اند. در زیر خلاصه از این مطالعات که بازگو کننده روند بررسی های انجام شده در سالهای اخیر است بیان می شود.

- مطالعات انجام شده توسط Song و Sungدر سال ۱۹۹۰ ، Sung *et al* در سال ۱۹۹۴، Sung *et al.* در سال ۱۹۹۸ در تایوان نشان می‌دهد که استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی برای میگوهایی که در مراحل اولیه زندگی هستند باعث بهبود رشد و کاهش تلفات می گردد.
- Nicoletti و همکاران در سال ۱۹۹۲ بیان کردند بدلیل واکنش بسیار دقیق بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان‌ها با گیرنده‌های موجود بر روی سلولهای فاگوسیت کننده، حتی در صورت تزریق این ترکیبات به جانوران تحمل خوبی از طرف جانوران دیده می‌شود و هیچگونه واکنش‌های آلژیک و واکنش های سمی علیه بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان دیده نمی‌شود.
- Schwab در سال ۱۹۹۳ فرم خالص شده پتپیدوگلیکان‌ها از باکتریهای مضر نیز بسیار سمی‌تر بوده و امکان ایجاد آرتریت توسط آنها می‌باشـــد.

- مطالعات نشان می‌دهد که بتا ۱و۳ ۱و۶ و گلوکان خالص بسیار هدفمند عمل کرده و بصورت اختصاصی بر ماکروفاژها، گرانولوسیت و سلولهای کشنده طبیعی (NK-Cellها) تأثیر می‌گذارد (Engstad, 1994; Engstad & Robertsen 1993).
- Raa در سال ۱۹۹۶ اعلام کرد بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان‌ها که در حال حاضر مطالعات زیادی روی آنها انجام شده است توانایی فعال کردن ماکروفاژها و افزایش سیستم غیر اختصاصی در حیوانات خونگرم، ماهیان و میگو را دارند و بر خلاف LPS ها و پپتیدوگلیکان‌ها، بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان‌ها تأثیر مستقیمی بر لنفولیست‌های تولید کننده آنتی بادی نداشته و لذا موجب تحریک لنفوسیت‌ها و تولید آنتی بادی علیه خود بتا۱و۳ ۱و۶ گلوکان نمی‌شوند و از این رو توانایی جاندار را در تولید آنتی بادیها به هدر نمی‌دهند.
- Hashino و همکاران در سال ۱۹۹۸ از عصاره محلول در آب داغ جلبکی بنام *Sargassum horneri* پلی‌ساکارید سولفاته استخراج کردند که قند اصلی آن فوکوس است و دارای خاصیت ضد ویروس قوی ضد ویروس های هرپس سیمپلکس تیپ یک، سیتومگالوویروس و ویروس ایدز می باشد نکته جالب توجه این است که برخلاف ترکیبات ضدویروس دیگر این ترکیب علاوه بر مهار عفونت ویروس در مراحل اولیه و جلوگیری از نفوذ و اتصال ویروس به داخل سلول، پس از ورود ویروس به سلول میزبان نیز اثر ضد ویروسی خود را اعمال می کند.
- مطالعات مشابه در تایلند نیز توسط Kidchakan وJuadee (۱۹۹۸) انجام شد. آنها نشان دادند که تیمار غوطه وری در بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر روی میگو موجب بهبود توانایی هوموسیت‌ها بمنظور مقاومت در برابر بیماری شده و آنها بهتر می‌توانند باکتریهای زنده را از همولمف حذف نمایند.
- Itami و همکارانش در سال ۲۰۰۲ از جلبک قهوه‌ای *Cladosiphan okamuranus* فوکوئیدان را استخراج کردند که یک پلی ساکارید سولفاته است و از آن در غذای میگوی *Kuruma* استفاده کردند و ۴ روز پس از اولین سری غذا دهی میگو ها را در سوسپانسیونی از WSV غوطه ور کردند و بر اساس نتایج آنها دوز بالای فوکوئیدان در پیشگیری از بیماری لکه سفید ویروسی موثرتر می باشد.

- Zhu و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ از عصاره محلول در آب داغ *Sargassum patens* پلی ساکارید سولفاته استخراج کردند که دارای اثرات ضد ویروس قوی بر علیه ویروس های هرپس سیمپلکس تیپ یک و دو می باشد.
- بر اساس گزارش Chotigeat و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده خوراکی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه ای *Sargassum polycystum* می تواند سبب کاهش اثر WSD بر پنئوس مونودون گردد. آنها فوکوئیدان را با غذای میگو های ۸-۵ گرمی و ۱۵-۱۲ گرمی مخلوط کردند و قبل از مواجهه وپس از گذشت ۱۰ روز از مواجهه با WSV غذا دهی میگوها را با غذای تیمار شده انجام دادند در صد بازماندگی در میگوهای بیمار۸-۵ گرمی و ۱۵-۱۲ گرمی به ترتیب ۴۶ و ۹۳ درصد بود. آنها همچنین مشاهده کردند که فوکوئیدان با غلظت (MIC) ۱۲ و *mg/ml* ۶ به ترتیب بر باکتری های ویبریو هاروی، استافیلوکوک ارئوس و اشریشیا کلی اثر بازدارندگی دارد.
- در مطالعه دیگری که Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی دوپامین انجام داده اند به این نتیجه رسیدند که میگوهای وانامی که به میزان mol/shrimp ۶-۱۰ دوپامین به آنها تزریق شده است نسبت به گروه شاهد که سالین به آنها تزریق شده بود، سیستم ایمنی فعالتری دارند. یکی از منابع عمده برای استخراج مواد دارویی، جلبک های دریایی هستند که توجه محققین را در سراسر جهان به خود جلب نموده است، پلی ساکارید های سولفاته و بخصوص فوکوئیدان یکی از موادی می باشد که از جلبک های دریایی استخراج شده ودارای اثرات ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد انگلی می باشد و در درمان سرطان ها نیز از آن استفاده شده است.
- Yehو همکاران در سال ۲۰۰۵ از عصاره آب گرم جلبک *Sargassum duplicatum* به صورت غوطه وری و تزریقی برای تحریک سیستم ایمنی میگوی لیتوپنئوس وانامی آلوده به *V.alginoliticus* استفاده کردند و سیتم ایمنی میگو را از طریق بررسی تعداد هموسیتهای کل، انفجار تنفسی، سیتم پروفنل اکسیداز و فعالیت فاگوسیتی هموسیتها مورد مطالعه قرار دادند و بر اساس گزارشهای آنها عصاره این جلبک سبب تحریک سیستم ایمنی و افزایش بازماندگی میگوهای آلوده در مقایسه با گروه شاهد می گردد.

۲- مواد و روشها

یکی از مشکلات عمده بر سر راه مطالعهٔ روش های مورد استفاده جهت بهبودِ مقاومتِ میگو در شرایط مختلف و تیمارهای مختلف، انتخاب فاکتورهای مناسب جهت تعیین سلامت میگو است (در این مطالعه فاکتورهای مربوط به سیستم ایمنی بطور اعم و دو فاکتور تعداد هموسیت کل (THC) و میزان پروتئین پلاسمای کل (TPP) بطور اخص برای این منظور در نظر گرفته شده است، دو فاکتور اخیر بعنوان شاخصهای سلامتی میگو پذیرفته شده اند(Sanchez *et al*,. 2001). در این مطالعه سعی بر این بوده که تأثیر یا تأثیرات حاصل از استفاده از یک محرک سیستم ایمنی در افزایش توانایی جلوگیری از بروز بیماری، علاوه بر روش مواجهه با عامل بیماریزا و بررسی میزان بازماندگی، از طریق اندازه گیری یا تعیین پارامترهای مربوط به سیستم ایمنی در همولمف میگوهای تیمار شده نیز ارزیابی گردد.

۲-۱- بررسی تأثیرات عصاره آب گرم جلبک‌های *S.glaucescens* و *P.boergeseni*

۲-۱-۱- تهیه عصاره از جلبک های مذکور

برای این منظور مراحل زیر بطور مجزا برای هر جلبک انجام شد:

۱) جمع آوری و شناسایی جلبک ها، این کار در اواسط بهمن ماه سال ۱۳۸۴ با کمک قایق صورت پذیرفت و جلبک *Sargassum glaucescens* از منطقه ساحلی و بین اسکله جفره تا اسکله جلالی و جلبک *Padina boergeseni* از خور عباسک (تصویر ۲) جمع آوری شده و در ظروف و کیسه های پلاستیکی تمیز به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده میگوی کشور منتقل گردید. علاوه براین از هر گونهٔ جلبک، نمونه ای به روش پیشنهاد شده توسط پژوهشکده آبهای دور، تهیه شد و جهت شناسایی جلبک ها در حد گونه به آن پژوهشکده ارسال گردید.

تصویر ۲- جمع آوری جلبک *Padina boergeseni* از خور عباسک

۲) شستشو و خشک کردن در دمای اتاق، برای این منظور جلبک های منتقل شده به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده میگوی کشور در ابتدا با آب جاری شسته شد و بر روی نایلون تمیزی که از قبل درآزمایشگاه پهن شده بود به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. لازم به ذکر است که با توجه به وجود ترکیبات سرب در روزنامه های موجود و امکان ایجاد خطا درآزمایش، جلبکهای جمع آوری شده پس از شستشو، بمنظور خشک شدن، بر روی نایلون قرار داده شدند.

۳) جوشاندن ۲۰ گرم از جلبکهای خشک شده در ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه به مدت ۳ ساعت (تصویر ۳)، با توجه به لزوم لئوفلیزه کردن عصاره استخراج شده در آزمایشگاه خصوصی بهار افشان در تهران و بمنظور جلوگیری از هرگونه تغییر در ترکیبات استخراج شده از جلبکها، از این مرحله به بعد در آزمایشگاه مذکور انجام شد تا بتوان پس از عصاره گیری سریعاً نسبت به لئوفلیزه کردن عصاره اقدام شود.

تصویر ۳- جوشاندن ۲۰ گرم از هر کدام از جلبک در ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه

۴) فیلتر کردن عصاره حاصل، برای این منظور از گاز استریل استفاده گردید.

۵)با توجه به توانایی جذب و تجمیع بیولوژیک فلزات سنگین توسط جلبکها(Barkhordar and Ghiasseddin, 2004) و تاثیرهای منفی اثبات شده فلزات سنگینی مثل سرب، مس، کادمیوم و جیوه بر سیستم ایمنی میگوها (Lorenzon et al., 2001)، بمنظور اندازه گیری میزان سرب در عصاره های استخراج شده، پس از عصاره گیری و فیلتراسیون، نمونه ای تهیه گردید و توسط بخش مربوطه در آزمایشگاه بهار افشان مورد بررسی قرار گرفت.

۶) لئوفلیزه کردن عصاره فیلتر شده برای تهیه پودر خشک از عصاره جلبکی

۷)آماده سازی غلظت های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره هر یک از این جلبک ها در آب دریا بمنظور تیمار کردن میگوها.

۲-۱-۲- بررسی تأثیرات هریک از غلظت های جلکبک های نامبرده بر میزان بازماندگی میگوها

۱۵۰۰ قطعه میگوی سفید هندی۱/۲۰±۱۱/۳۲ گرمی از مزارع پرورش میگو (تصویر ۴) به ایستگاه تحقیقاتی شغاب انتقال یافته و در تانک های چهار هزار لیتری به مدت ۲ هفته استرس زدایی شدند. از این میگوها برای انجام تمامی تیمارهای این طرح استفاده گردید.

تصویر٤- استفاده از تور پرتابی(الف) بمنظور نمونه گیری تصادفی از میگوهای موجود در استخرهای پرورشی برای انتقال و آداپتاسیون در ایستگاه تحقیقاتی شغاب (ب)

با توجه به تغییرات فیزیولوژیک در هنگام پوست اندازی و تأثیرپذیری سیستم ایمنی از این تغییرات، در این بخش از مطالعه، میگوهایی که در مرحله بین دو پوست اندازی، مرحله C، هستند (بر اساس روش Promwikorn و همکاران، ۲۰۰۴) انتخاب شده و برای انجام تیمارهای مورد نظر (جدول شماره ۱) به تانک های ۳۰۰ لیتری که حاوی ۱۵۰ لیتر آب دریا می باشند انتقال یافتند.

مواجهه با ویروس	عصاره آب گرم جلبک mg/l	تعداد میگو
منفی	شاهد	۳ × ۱۰
مثبت	شاهد	۳ × ۱۰
مثبت	۱۰۰	۳ × ۱۰
مثبت	۳۰۰	۳ × ۱۰
مثبت	۵۰۰	۳ × ۱۰

جدول شماره ۱- تیمارهای مربوط به بررسی تأثیر غوطه وری در مقادیر مختلف عصاره آب گرم جلبک های مورد مطالعه و مواجهه یا عدم مواجهه با ویروس لکه سفید در هر تیمار، میگوها به مدت ۴ ساعت در غلظت های مذکور غوطه ور می شوند و سپس از میگوهای تلف شده بر اثر بیماری لکه سفید (WSD) برای آلوده کردن میگوها استفاده می شد. برای تهیه سوسپانسیون ویروسی از میگوهای تلف شده بر اثر WSD (که پس از انجام تست PCR و مثبت شدن نتیجه، منجمد شده اند) برای آلوده کردن میگوها استفاده می شود. پس از یخ زدایی و هموژنیزه کردن عضله میگوهای مذکور و محتویات سفالوتراکس، با استفاده از فیلتراسیون ۰/۴۵ میکرونی، باکتری زدایی شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی صاف شده به میگوها تزریق گردید و میزان بازماندگی میگوها در هر تیمار پس از گذشت ۶ ،۱۲ و ۲۴ ساعت و سپس به مدت ۱۴ روز، بصورت روزانه، بررسی و ثبت می گردید.

۳-۱-۲- بررسی تأثیرات غلظت‌های مختلف هریک از جلبک‌ها بر پارامترهای سیستم ایمنی میگو:

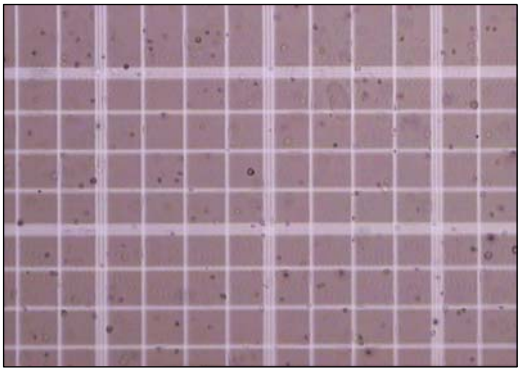
با توجه به حساس بودن سیستم ایمنی و تاثیر استرسهای گوناگون بر روی عملکرد این سیستم، تیمارهای مربوط به تعیین یا اندازه گیری فاکتورهای سیستم ایمنی، در آزمایشگاه انجام گرفت و تیمارها در اکواریوم های ۱۵۰ لیتری که حاوی ۱۰۰ لیتر آب دریا بودند، طبق جدول شماره ۲آماده شدند.

غوطه ور شدن در عصاره آب گرم جلبک mg/l	تعداد میگو
شاهد	۳ × ۱۰
۱۰۰	۳ × ۱۰
۳۰۰	۳ × ۱۰
۵۰۰	۳ × ۱۰

جدول شماره ۲- تیمارهای مربوط به بررسی تاثیر غوطه وری در غلظتهای مختلف هر یک از جلبکها بر پارامترهای سیستم ایمنی میگو

پس از زمانهای صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت، پس ازآغاز غوطه وری، اقدام به آسپیراسیون همولنف و اضافه کردن ترکیب ضد انعقاد (محلول Alsever) گردید. به منظور ارزیابی تأثیر تیمارهای غوطه وری بر عملکرد سیستم ایمنی، فاکتورهای تعداد هموسیت کل (THC)، میزان پروتئین پلاسمای کل(TPP)، فعالیت فاگوسیتی هموسیت ها، فعالیت باکتری کشی همولنف و توانایی پاکسازی باکتریایی تعیین و اندازه گیری شد.

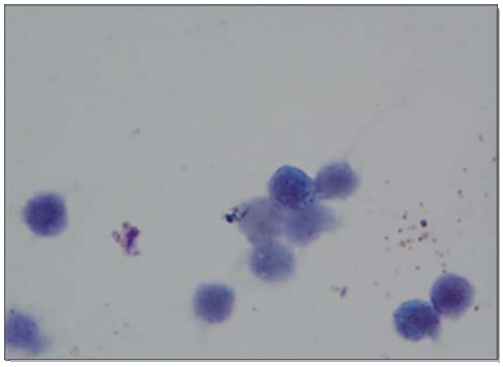
برای تعیین THC، از سینوس شکمی و از بند دوم نسبت به نمونه برداری همولنف اقدام شد. برای این منظور از سرنگ ۱ ml که حاوی ۰/۴ ml آنتی کوآگولانت(محلول Alsever شامل 27 mM Na citrate, 336 mM NaCl, 9 mM EDTA,115 mM glucose, pH 4.6) با دمای۴ درجه سانتیگراد و pH ۷/۲ می باشد(Jiang *et al*., 2004) استفاده گردید. پس از نمونه برداری محتویات سرنگ به اپندروف استریل مخصوص سانتریفیوژ که از قبل حاوی ml ۰/۴ آنتی کوآگولانت استریل بود انتقال می یافت و ۲۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی لام هموسیتومتر قرار میگرفت و با بزرگنمایی ×۴۰ شمارش می شد(تصویر ۵). همولنف باقی مانده در اپندورف ها تا ۱ ساعت پس از نمونه برداری در یخ قابل نگهداری بوده و از آن برای اندازه گیری سایر فاکتورهای سیستم ایمنی استفاده می شود. برای اندازه گیری TPP نیز از روش روتین Biuret که برای اندازه گیری میزان پروتئین در مایعات بدن، درآزمایشگاه های تشخیص طبی نیز استفاده می شود، بهره گرفته شد (Acharya *et al*., 2004) .



تصویر ۵- نمایی از اسلاید هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی × ٤٠

بمنظور اندازه گیری فعالیت فاگوسیتوزی ۲۵ میکرولیتر از همولنف آماده شده درون اپندروف را بر روی اسلاید شیشه ای تمیز انتقال یافته و min ۳۰ در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۲۵ میکرولیتر باکتری *Vibrio harveyi* به غلظت $۱۰^{۸}\times ۱$ سلول در میلی لیتر به اسلاید اضافه گردید و min ۳۰ در دمای اتاق انکوبه شد. سپس اسلایدها را با آنتی کواگولانت شستشو داده و با گلوتارآلدئید ۴٪ در محلول آنتی گواگولانت، به مدت min ۱ تثبیت شد. در مرحله بعد اسلایدها به مدت min ۱ با آب مقطر شستشو داده شد و با اتانل مطلق به مدت min ۱ تثبیت گردید. اسلایدها را در مجاورت هوا خشک کرده و سپس با تولوئیدن بلو به مدت min ۵ رنگ آمیزی کرده و رنگ اضافه با آب جاری حذف گردید. پس از این مراحل اسلاید ها با کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ×۱۰۰ مورد مطالعه قرارگرفته و ۲۰۰ هموسیت شمارش شد(تصویر ۶) و تعداد هموسیت هایی که باکتری را هضم کرده اند، ثبت می شد .(Jiang *et al.*, 2004 and Lui *et al.*, 2004) درصد فاگوسیتوز از فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد فاگوسیتوز=(تعداد هموسیت هایی که باکتریها را هضم کرده اند / تعداد کل هموسیهای مشاهده شده) × ۱۰۰

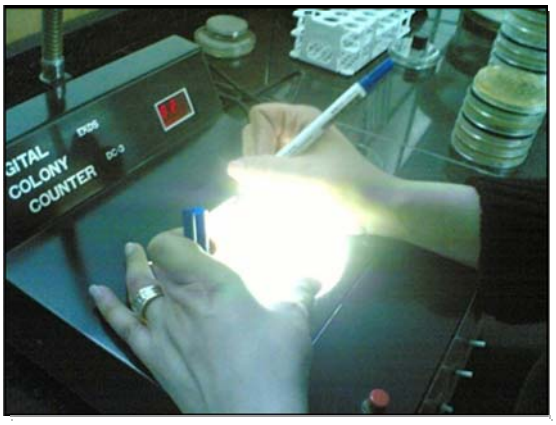


تصویر ٦- هموسیت های میگوی سفید هندی
در حال فاگوسیتوز باکتریهای *Vibrio harveyi*

برای اندازه گیری فعالیت باکتری کشی، باکتری *Vibrio harveyi* در محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی ۱/۵ ٪ NaCl بمدت یک شب در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ کشت داده شد و باکتریها پس از رشد کردن با کمک دستگاه سانتریفیوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جمع آوری شده و با استفاده از سرم استریل ۲٪ شستشو و برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی با تراکم نوری ۰/۱ در طول موج nm ۵۴۰ (تصویر۷) رقیق شدند.

تصویر ۷- دستگاه اسپکترومتر جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی با تراکم نوری ۰/۱ در طول موج ٥٤٠ nm

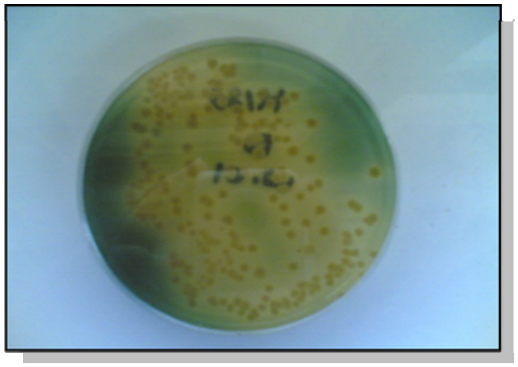
همولنف آسپیره شده به همراه آنتی کواگولانت با سرعت g ×۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر همولنف فاقد سلول انکوبه می شد. برای انکوباسیون از میکروتیوب های استریل استفاده می گردید (۳ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد). پس از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از میکروتیوب ها به محیط کشت TCBS جامد منتقل می شد و کلنی کانت(تصویر ۸) انجام می گرفت (Yeh *et al.*, 2005).



تصویر ۸ – شمارش کلنی های رشد کرده بر روی محیطهای کشت تلقیح شده، به کمک دستگاه کلنی شمار

برای تعیین توانایی پاکسازی باکتریایی، پس از تزریق $۱۰^{۵} \times ۱$ باکتری *Vibrio harveyi* به هر میگو و گذشت ۳ساعت از زمان تزریق، ۱۰۰ میکرولیتر همولنف از سینوس شکمی میگو آسپیره شده و به اپندروف استریل حاوی ۱/۹ ml محلول استریل سرد شده (Van Harrevald's Solution)

VHS منتقل می شود. سپس بر روی محیط کشت TCBS جامد کشت شده و پس از ۱۸ ساعت شمارش می شود (Yeh *et al.*, 2005).



تصویر ۹- باکتریهای *Vibrio harveyi*

در محیط TCBS

٤-۱-۲- روش تهیه ویروس و مواجهه

از میگوهای تلف شده بر اثر بیماری لکه سفید (که پس از انجام تست PCR، منجمد شده اند) برای آلوده کردن میگوها استفاده می گردید. برای تهیه سوسپانسیون ویروسی، میگوهای ذکر شده در ابتدا یخ زدایی می شد و پس از هموژنیزه کردن عضله میگوهای ذکر شده، با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی فیلتر می شد. بمنظور فعال کردن ویروس موجود در لاشه های فریز شده، به میزان ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ویروسی تهیه شده در ابتدا به تعدادی از میگوهای تزریق می شد و در صورت مشاهده تلفات در این میگوها، از لاشه این میگوها برای تهیه سوسپانسیون ویروسی جهت تزریق به میگوهای تیمارها استفاده می گردید.

تصویر ۱۰- تغذیه میگوها با لاشه های میگوهای مبتلا به بیماری لکه سفید
بمنظور فعال سازی ویروس لکه سفید جهت مواجهه میگوها

۲-۲- بررسی تأثیر بتا ۱و۳ ۱و٦ خوراکی

۱-۲-۲- تهیه غذای حاوی بتا ۱ و ۱۳ و ٦ گلوکان

برای اضافه کردن ترکیبات محرک رشد به غذای پلت شده باید به گونه ای عمل می شد که پس از اضافه کردن مواد محرک سیستم ایمنی به غذای پلت شده ، غذا در آب حل نشود برای این منظور از آگاراستفاده شد:

۱. پودر کردن غذای پلت شده
۲. افزودن آب (۳/۵ درصد وزن خشک)
۳. حرارت دهی در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتیگراد
۴. مخلوط کردن با همزن با دور بالا
۵. اضافه کردن بتا ۱و۳، ۱و۶گلوکان
۶. مخلوط کردن با همزن با دور بالا
۷. افزودن آگار بعنوان قابض (۰/۰۵ تا ۰/۱ درصد وزن خشک)
۸. مخلوط کردن با همزن با دور بالا
۹. نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز
۱۰. انتقال به دمای منفی ۱۵ درجه سانتیگراد
۱۱. تبدیل به قطعات مورد نظر

چون در این مطالعه از میگوهای با میانگین وزنی ۱/۲۰± ۱۱/۳۲ گرمی استفاده می شد، لذا طبق استاندارد اندازه قطعات غذا ۵ × ۲/۲ میلیمتر و حد اکثر مواد پودری در حدود ۰/۵ درصد در نظر گرفته شد.

۲-۲-۲- بررسی تاثیر غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر بازماندگی و پارامترهای سیستم ایمنی میگوها

برای انجام این بخش از مطالعه، تیمارها بصورت جدول شماره ۳ بسته شد. برای بررسی تاثیر غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان (تهیه شده از محصول High Dose High Purified Beta 1,3/1,6 Glucan متغلق به شرکت WPS southeastern Pharmaceutical, USA با ۸۷ درصد خلوص) بر پارامترهای سیستم ایمنی، تیمارها به مدت ۱۴ روز در چهار نوبت با غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان تغذیه شدند و پس از گذشت ۱۴ روز، در ابتدا از هر کدام از تکرارها، از سه میگو، که در مرحله بین دو پوست اندازی، مرحله C، اقدام به جمع آوری همولنف شد و برای ارزیابی تأثیر تغذیه انجام شده با غذای حاوی مقادیر متفاوت بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر روی سیستم ایمنی، مورد استفاده قرار گرفت و سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی تهیه شده به هر میگو تزریق شد و میزان بازماندگی میگوها در هر تیمار پس از گذشت ۱۲، ۶ و ۲۴ ساعت و سپس بصورت روزانه به مدت ۱۴ روز بررسی و ثبت گردید.

تغذیه با غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶گلوکان (گرم بر کیلوگرم)	تعداد میگو
شاهد	۳ × ۱۳
۲	۳ × ۱۳
۱۰	۳ × ۱۳
۲۰	۳ × ۱۳

جدول شماره ۳- تیمارهای مربوط به بررسی تأثیرات تغذیه میگوهای سفید هندی با غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶گلوکان بر سیستم ایمنی و میزان بازماندگی.

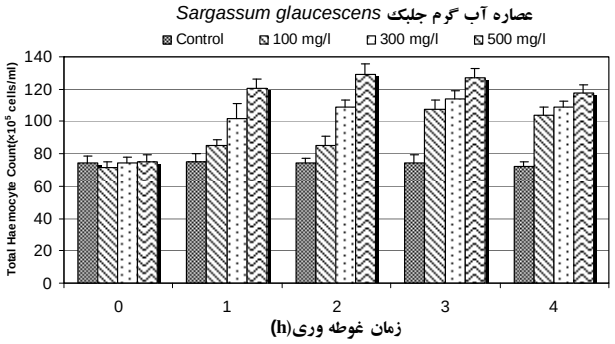
۳- نتایج

۱-۳- تاثیر غوطه وری در غلظت های مختلف عصاره آب گرم جلبک S.glaucescens بر شاخص هـای ایمنی و بازماندگی میگوهای سفید هندی:

میزان THC و TPP در میگوهـای غوطـه ور شـده در غلظـت ۳۰۰ و ۵۰۰ میلـی گـرم در لیتـر از عـصاره آب گـرم جلبک *S.glaucescens* پس از ۱ ساعت و در مورد تیمـار غوطـه وری در غلظـت ۱۰۰ میلـی گـرم در لیتـر پـس از گذشت ۲ ساعت، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان دادند(جدولهای شـماره ۴ و ۵ ونمودارهای شماره ۳ و ۴).

غلظت های غوطه وری (mg/l)	تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۷٤/۳٦±٤/۰۰	۷۵/۳٦±٤/۹۵	۷٤/۰۳±۳/۵۱	۷٤/٤۳±٤/۸۵	۷۱/۸۳±۳/۱۷
۱۰۰	۷۱/۳۳±۳/۹٦	۸۵/۳٦±۳/٤۲	۸۵/۰۳±۵/۹۵	۱۰۷/۵۳±۵/۹۵	۱۰۳/۸٦±۵/۳٦
۳۰۰	۷٤/۵٦±۳/٤۰	۱۰۱/٤۰±۹/٤۳	۱۰۸/٦٦±٤/۹۰	۱۱٤/۳۳±٤/٤۵	۱۰۸/۹۰±۳/٦۷
۵۰۰	۷۵/۱۰±٤/٤۹	۱۲۰/۱٦±۵/۷۸	۱۲۹/۳۰±٦/۳۹	۱۲۷/۰۳±۵/۷٤	۱۱۷/۷٦±٤/۸۵

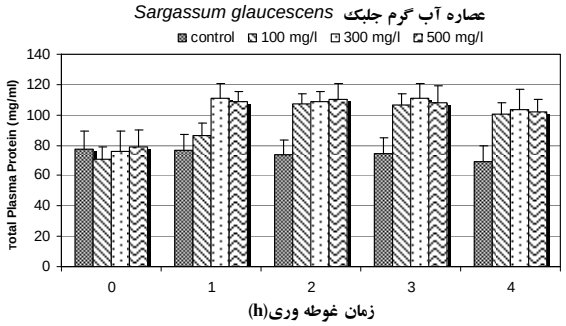
جدول شماره ٤- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *Sargassum glaucescens*.



نمودار شماره ۳- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*.

غلظت های غوطه وری (mg/l)	پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۷۷/۱٦±۱۲/۳۵	۷٦/۳۷±۱۰/۵۳	۷۳/۸۵±۹/٤۲	۷٤/۲۲±۱۰/۹۳	٦۹/۱٦±۱۰/۸٦
۱۰۰	۷۰/۷۳±۸/۱٤	۸٦/۵٤±۷/۸۸	۱۰۷/۱۲±۷/۰۹	۱۰٦/۵۸±۷/۰۹	۱۰۰/۷٤±۷/۳۵
۳۰۰	۷٦/۱۰±۱۲/۹۷	۱۱۰/۸۵±۹/۷۲	۱۰۸/۹۰±٦/٤۷	۱۱۰/۵۹±۹/۷۹	۱۰۳/۷۳±۱۳/۰٦
۵۰۰	۷۸/۷۹±۱۱/۰۱	۱۰۸/۸۲±٦/٦۵	۱۱۰/۱۱±۱۰/۷۵	۱۰۷/٦۳±۱۱/۷٤	۱۰۲/۱۷±۷/۷۸

جدول شماره ۵- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*

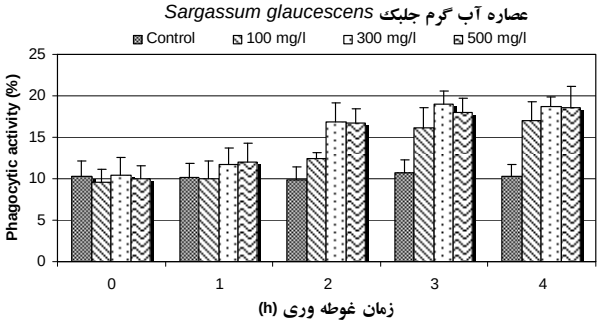


نمودار شماره ٤- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*.

فعالیت فاگوسیتوزی (جدول شماره ۶ و نمودار شماره ۵) در میگوهای سفید هندی غوطه ور شده در غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* پس از ۲ ساعت و در مورد تیمار غوطه وری در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پس از گذشت ۳ ساعت، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان داد.

غلظت های غوطه وری (mg/l)	فعالیت فاگوسیتی (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۱۰/۲٤±۱/۸۳	۱۰/۱۸±۱/٦۵	۹/۸۵±۱/٦٤	۱۰/٦۵±۱/٦٤	۱۰/۲۷±۱/٤۵
۱۰۰	۹/٦۲±۱/۵٦	۱۰/۰۳±۲/۰٤	۱۲/٤٦±۰/٦٤	۱٦/۱۳±۲/٤۸	۱٦/۹٦±۲/۳۷
۳۰۰	۱۰/۳٦±۲/۱۹	۱۱/۷۰±۲/۰۷	۱٦/۸۷±۲/۲۷	۱۸/۹۵±۱/٦۱	۱۸/٦۹±۱/۱۸
۵۰۰	۱۰/۰٦±۱/٤۷	۱۲/۰۱±۲/۲۳	۱٦/۷۱±۱/٦۷	۱۸/۰۲±۱/۷٦	۱۸/۵۱±۲/٦۲

جدول شماره ٦- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S. glaucescens*

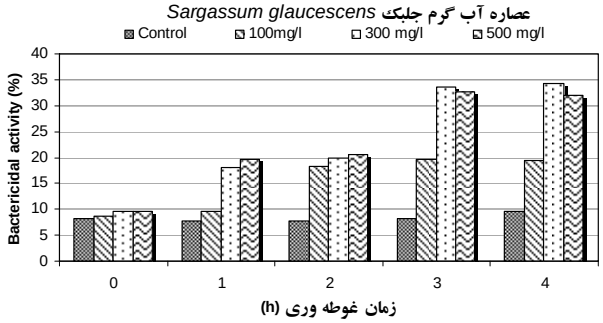


نمودار شماره ۵- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی
برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*

فعالیت باکتری کشی و توانایی حذف باکتری (جدولهای شماره ۷ و ۸ و نمودارهای شماره ۶ و ۷) در میگوهای سفید هندی که به مدت ۱ ساعت در غلظتهای ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر یا به مدت ۲ ساعت در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* غوطه ور شده اند، تفاوت معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان دادند.

غلظت های غوطه وری (mg/l)	فعالیت باکتری کُشی (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۸/۳۳±۳/۵۱	۷/٦۷±۱/۱۵	۷/٦۷±۳/۰۵	۸/۳۳±۳/۰۵	۹/٦۷±۲/۸۸
۱۰۰	۸/٦۷±۱/۱۵	۹/٦۷±۳/۲۱	۱۸/۳۳±٤/۵۰	۱۹/٦۷±۵/۰۳	۱۹/۳۳±۸/۰۸
۳۰۰	۹/٦۷±٤/۰٤	۱۸/۰۰±۵/۰۰	۲۰/۰۰±۸/۰۰	۳۳/٦۷±٤/۰٤	۳٤/۳۳±۱۰/۹٦
۵۰۰	۹/٦۷±۲/۵۱	۱۹/٦۷±٦/۰۲	۲۰/٦۷±٦/۳۵	۳۲/٦۷±۸/۱٤	۳۲/۰۰±٦/۵۵

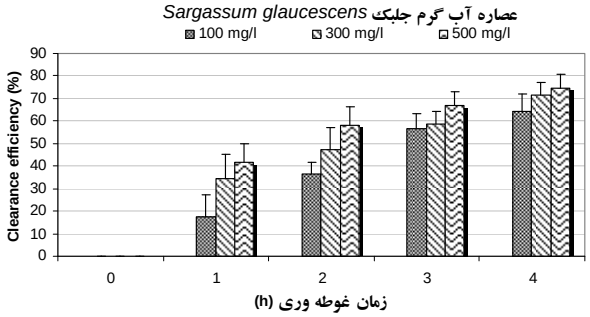
جدول شماره ۷- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی
برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*



نمودار شماره ٦- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی
برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*

غلظت های غوطه وری (mg/l)	توانایی حذف باکتری (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
۱۰۰	–	۱۷/۶۷±۹/۶۰	۳۶/۶۷±۵/۱۳	۵۶/۳۳±۷/۰۲	۶۴/۳۳±۷/۵۷
۳۰۰	–	۳۴/۳۳±۱۰/۹۶	۴۷/۳۳±۹/۷۱	۵۸/۶۷±۵/۸۵	۷۱/۶۷±۵/۵۰
۵۰۰	–	۴۱/۶۷±۸/۳۲	۵۸/۳۳±۸/۰۲	۶۶/۶۷±۶/۱۱	۷۴/۶۷±۵/۸۵

جدول شماره ۸- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*



نمودار شماره ۷- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*

عصاره آب mg/l	تعداد	زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)، میزان بازماندگی (درصد) و تعداد میگوهای زنده در هر تکرار									
		٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤
شاهد منفی (saline)	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)
شاهد مثبت (virus)	۳×۱۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)	۹۰±۱۰ (۸، ۱۰ و ۹)	۹۰±۱۰ (۸، ۱۰ و ۹)	۸۶±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۷۶/۷±۱۱/۵ (۷، ۷ و ۹)	۶۶/۷±۲۰/۸ (۵، ۶ و ۹)	۶۰±۱۰ (۵، ۶ و ۷)	۵۶/۷±۵/۸ (۵، ۶ و ۶)	۵۳/۳±۵/۸ (۵، ۶ و ۵)	۴۰±۱۰ (۴، ۵ و ۳)
۱۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۳±۵/۸ (۹، ۹ و ۱۰)	۹۰±۱۰ (۸، ۹ و ۱۰)	۸۶/۷±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۸۰/۷±۱۰ (۸، ۷ و ۹)	۷۳/۳±۵/۸ (۷، ۷ و ۸)	۷۳/۳±۵/۸ (۷، ۷ و ۸)	۶۳/۳±۵/۸ (۷، ۶ و ۶)	۶۳/۳±۵/۸ (۷، ۶ و ۶)
۳۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۳±۱۰ (۱۰، ۹ و ۹)	۹۰±۰ (۹، ۹ و ۹)	۸۳/۳±۵/۸ (۹، ۸ و ۸)	۸۰±۱۰ (۹، ۸ و ۷)	۸۰±۱۰ (۹، ۸ و ۷)
۵۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۸)	۸۰±۰ (۹، ۸ و ۷)	۷۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۷)

جدول شماره ۹- میزان بازماندگی میگوهای سفید هندی *(Fenneropenaeus indicus)* مواجهه دادشده با ویروس لکه سفید، پس از ۳ ساعت غوطه وری در آب دریایِ هوادهی شدهٔ حاوی عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* .

در میگو های گروه شاهد منفی و مثبت و همچنین میگوهای تیمار شده، که به مدت ۳ ساعت در غلظتهای ۱۰۰،۳۰۰ و ۵۰۰ میلیگرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens*غوطه ورشدند و در پایان این مدت ۱

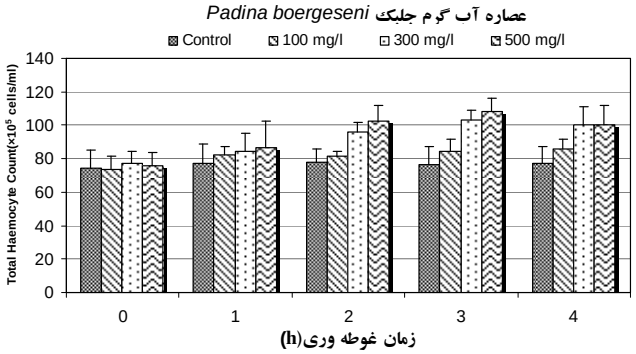
/۰میلی‌لیتر از سوسپانسیون ویروسی به هر میگو تزریق شد.(به غیر از گروه شاهد منفی که بجای سوسپانسیون ویروسی سرم فیزیولوؤی دریافت نمودند)،درپایان دوره ۱۴روزه پس از تزریق، میانگین بازماندگی بترتیب به ۷۶/۷±۵/۸ ۷۶/۷±۵/۸ ،۹۶/۷±۵/۸ ،۱۰±۴۰،۸±۵/۸،۱۰/۳±۶۳،۸۰ و۷۶/۷±۵/۸ درصد رسید.آنالیز ANOVA یک طرفه در هفته اول پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی اختلاف معنی داری را نشان نداد ولی در پایان هفته دوم اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد مثبت و منفی ($p < 0.001, df = 14$) نشان داد. در پایان هفته دوم پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی،میانگین بازماندگی در میگوهای شاهد مثبت با میگوهای تیمار ۱۰۰ میلیگرم در لیتر عصاره جلبک ($p = 0.027, df = 14$)،تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره جلبک ($p = 0.001, df = 14$) و تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر جلبک ($p = 0.003, df = 14$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

۲-۳- تاثیر غوطه وری در غلظتهای مختلف عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni در شاخصهای ایمنی و بازماندگی میگوهای سفید هندی:

میزان THC و TPP در میگوهای غوطه ور شده در غلظت۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* پس از ۲ ساعت، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان دادند (جدولهای شماره ۱۰ و ۱۱ و نمودارهای شماره ۸ و ۹). فعالیت فاگوسیتوزی در میگوهای سفید هندی غوطه ور شده در غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* پس از ۲ ساعت و در مورد تیمار غوطه وری در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پس از گذشت ۳ ساعت، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان داد (جدول شماره ۱۲ و نمودار شماره ۱۰).

غلظت های غوطه وری (mg/l)	تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۷۴/۶۶±۱۰/۲۰	۷۷/۲۳±۱۱/۱۸	۷۸/۲۰±۷/۴۴	۷۶/۷۶±۱۰/۵۳	۷۷/۵۰±۹/۹۵
۱۰۰	۷۳/۴۶±۸/۳۵	۸۲/۴۰±۴/۷۵	۸۱/۲۶±۳/۰۶	۸۴/۶۳±۷/۳۷	۸۵/۸۳±۵/۶۰
۳۰۰	۷۶/۹۶±۷/۷۲	۸۴/۱۳±۱۰/۹۲	۹۶/۲۳±۵/۳۱	۱۰۳/۳۰±۵/۷۶	۱۰۰/۵۳±۱۰/۷۹
۵۰۰	۷۵/۸۰±۷/۷۵	۸۶/۷۳±۱۶/۰۶	۱۰۲/۵۶±۹/۳۴	۱۰۸/۰۳±۸/۲۱	۱۰۰/۵۳±۱۱/۳۲

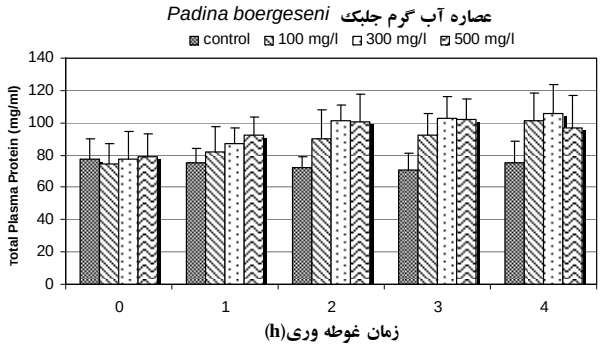
جدول شماره ۱۰- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni



نمودار ۸- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* .

غلظت های غوطه وری (mg/l)	پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) و زمان غوطه وری (h)			
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۷۷/۳۵±۱۳/۱۱	۷۵/۵۷±۸/۵۰	۷۲/۲۳±۷/۰۳	۷۰/۷۱±۱۰/۱۸	۷۵/۳۹±۱۳/۲۸
۱۰۰	۷۴/۸۲±۱۱/۹۷	۸۲/۱۶±۱۵/۳۴	۹۰/۱۰±۱۸/۱۰	۹۲/۲۱±۱۳/۱۷	۱۰۳/۳۳±۱۷/۳۹
۳۰۰	۷۸/۸۷±۱۷/۰۷	۸۷/۳۴±۹/۸۲	۱۰۱/۵۹±۹/۵۰	۱۰۲/۷۱±۱۳/۱۹	۱۰۵/۸۴±۱۷/۵۲
۵۰۰	۷۸/۸۷±۱۳/۹۲	۹۲/۱۱±۱۱/۴۷	۱۰۰/۶۱±۱۶/۸۷	۱۰۲/۲۵±۱۲/۷۳	۹۶/۸۱±۱۹/۹۰

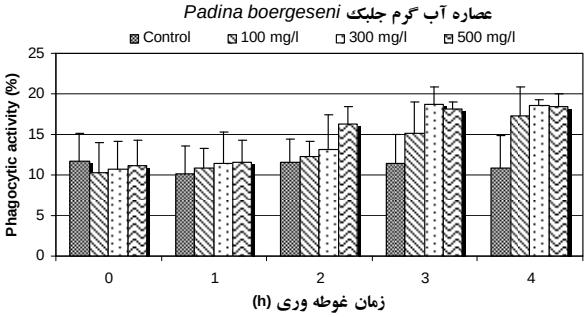
جدول شماره ۱۱- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni .



نمودار شماره ۹- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni.

غلظت های غوطه وری (mg/l)	فعالیت فاگوسیتی (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۱۱/۶۶±۳/۴۶	۱۰/۱۲±۳/۴۶	۱۱/۶۰±۲/۸۰	۱۱/۴۶±۳/۴۶	۱۰/۸۴±۴/۰۴
۱۰۰	۱۰/۲۵±۳/۷۸	۱۰/۸۱±۲/۴۳	۱۲/۲۵±۱/۸۲	۱۵/۱۶±۳/۸۸	۱۷/۲۴±۳/۶۷
۳۰۰	۱۰/۶۴±۳/۵۳	۱۱/۴۳±۳/۸۱	۱۳/۱۷±۴/۲۴	۱۸/۷۸±۲/۰۶	۱۸/۵۴±۰/۷۳
۵۰۰	۱۱/۱۷±۳/۱۰	۱۱/۶۰±۲/۶۶	۱۶/۲۲±۲/۲۳	۱۸/۱۷±۰/۸۷	۱۸/۴۶±۱/۴۷

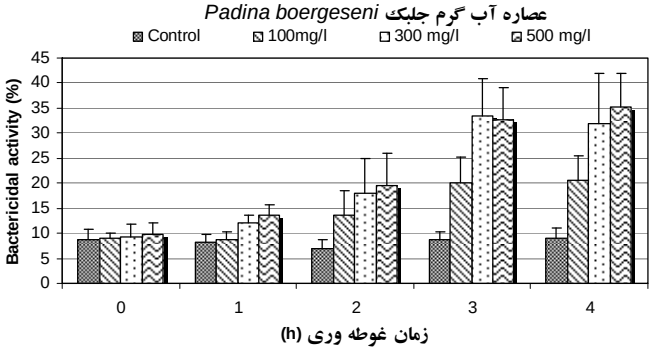
جدول شماره ۱۲- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبکP.boergeseni.



نمودار شماره ۱۰- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni.

غلظت های غوطه وری (mg/l)	فعالیت باکتری کُشی (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
شاهد	۸/۶۷±۲/۰۸	۸/۳۳±۱/۵۲	۷/۰۰±۱/۷۳	۸/۶۷±۱/۵۲	۹/۰۰±۲/۰۰
۱۰۰	۹/۰۰±۱/۰۰	۸/۶۷±۱/۵۲	۱۳/۶۶±۴/۷۲	۲۰/۰۰±۵/۲۹	۲۰/۶۷±۴/۷۲
۳۰۰	۹/۳۳±۲/۵۱	۱۲/۰۰±۱/۷۳	۱۸/۰۰±۷/۰۰	۳۳/۳۳±۷/۵۰	۳۲/۰۰±۹/۸۴
۵۰۰	۹/۶۷±۲/۳۰	۱۳/۶۷±۲/۰۸	۱۹/۶۷±۶/۴۲	۳۲/۶۷±۶/۵۰	۳۵/۳۳±۶/۶۵

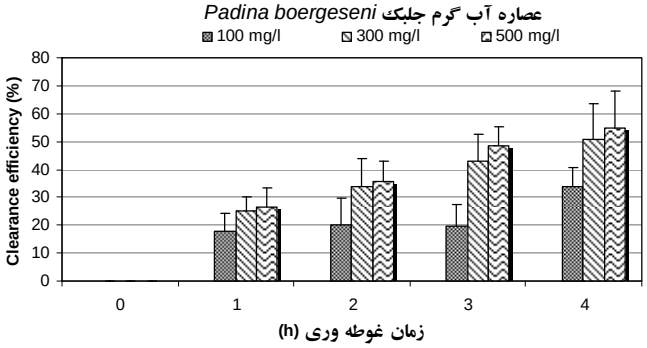
جدول شماره ۱۳- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک P.boergeseni.



نمودار شماره ۱۱- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* .

غلظت های غوطه وری (mg/l)	توانایی حذف باکتری (درصد) و زمان غوطه وری (h)				
	۰	۱	۲	۳	٤
۱۰۰	–	۱۷/۶۷±۶/۳۵	۲۰/۳۳±۹/۲۹	۱۹/۶۷±۷/۶۳	۳۴/۰۰±۶/۵۵
۳۰۰	–	۲۵/۳۳±۴/۷۲	۳۳/۶۷±۱۰/۰۱	۴۳/۰۰±۹/۶۴	۵۰/۶۷±۱۳/۰۵
۵۰۰	–	۲۶/۳۳±۷/۰۲	۳۵/۶۷±۷/۵۰	۴۸/۶۷±۶/۵۰	۵۵/۰۰±۱۳/۱۱

جدول شماره ١٤- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبکP.boergeseni **.**



نمودار شماره ۱۲- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب زمان غوطه وری در عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* .

فعالیت باکتری کشی (جدول شماره ۱۳ و نمودار شماره ۱۱) در میگوهای سفید هندی پس از ۲ ساعت غوطه وری در غلظتهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni* ، تفاوت معنی داری ($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان دادند ولی توانایی حذف باکتری در این میگوها پس از ۲ ساعت غوطه وری در غلظتهای ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره آب گرم جلبک مذکور ، تفاوت معنی‌اری($p < 0.05$) را نسبت به میگوهای شاهد نشان دادند(جدول شماره ۱۴ و نمودار شماره ۱۲).

عصاره آب گرم mg/l	تعداد	زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)، میزان بازماندگی (درصد) و تعداد میگوهای زنده در هر تکرار										
		٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤
شاهد منفی (saline)	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)
شاهد مثبت (virus)	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)	۹۳/۳±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۹)	۹۰/۰ ±۵/۸ (۹، ۹ و ۹)	۹۰/۰ ±۰/۰ (۹، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۹)	۸۳/۳±۵/۸ (۸، ۸ و ۹)
۱۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)	۹۳/۳±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۹)	۹۰/۷±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۸، ۹ و ۹)	۸۰/۰±۵/۸ (۸، ۷ و ۹)
۳۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۳/۳±۵/۸ (۹، ۹ و ۱۰)	۹۰/۰ ±۱۰/۰ (۸، ۹ و ۱۰)	۹۰/۰ ±۱۰/۰ (۹، ۸ و ۷)
۵۰۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۹ و ۱۰)

جدول شماره۱۵- میزان بازماندگی میگوهای سفید هندی *(Fenneropenaeus indicus)* مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ۳ ساعت غوطه وری در آب دریای هوادهی شدهٔ حاوی عصاره آب گرم جلبک *P.boergeseni*

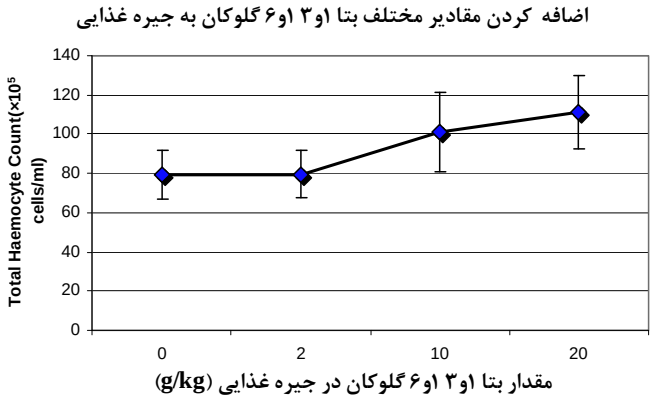
در میگوهای گروه شاهد منفی و مثبت و همچنین میگوهای تیمار شده که به مدت ۳ ساعت در غلظت‌های ۱۰۰،۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره جلبک *P.boergeseni* در لیتر غوطه ور شدند و در پایان این مدت،۰/۱ میلی‌متر از سوسپاسیون ویروسی به هر میگو تزریق شد(به غیر از گروه شاهد منفی که بجای سوسپانسیون ویروسی سرم فیزیولوژی در یافت نمودند)،در پایان دوره ۱۴ روزه پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی، بازماندگی بترتیب به ۹۶/۷±۵/۸، ۸۳/۳±۵/۸، ۸۰/۰±۵/۸، ۹۰/۰ ±۱۰/۰ و ۹۶/۷±۵/۸ درصد رسید. آنالیز ANOVA یک طرفه اختلاف معنی داری را پس از گذشت دو هفته از تزریق سوسپانسیون ویروسی حتی بین شاهد مثبت و منفی ($p = 0.288$, $df = 14$) نشان داد.

۳-۳- تاثیر تغذیه با غذای حاوی بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر شاخص های ایمنی و بازماندگی میگوهای سفید هندی:

میزان THC، TPP ، فعالیت فاگوسیتوزی، فعالیت باکتری کشی و توانایی حذف باکتری در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ و ۲۰ گرم بر کیلوگرم بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان نسبت به میگوهای شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲ گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی داری ($p<0.05$) را نشان دادند(جدولهای شماره ۱۶ تا ۲۰ و نمودارهای شماره ۱۳ تا ۱۷) .

مقادیر بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان موجود در جیره غذایی (g/kg)	تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×)
شاهد	۷۹/۳۸±۱۲/۴۵
۲	۷۹/۴۱±۱۲/۰۷
۱۰	۱۰۱/۳۷±۲۰/۲۴
۲۰	۱۱۱/۳۵±۱۸/۹۰

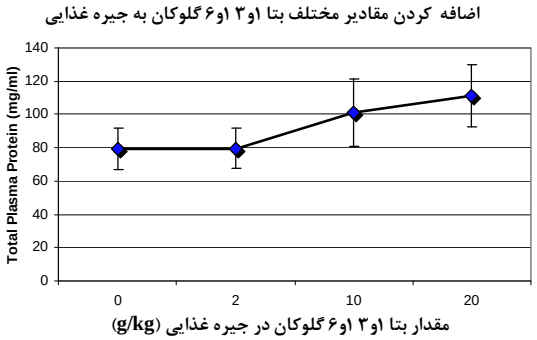
جدول شماره ۱۶- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)



نمودار شماره ۱۳- تعداد هموسیت کل(10^5cell/ml×) در میگوی سفید هندی برحسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)

مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)	فعالیت فاگوسیتی (درصد)
شاهد	۱۱/۰۱±۲/۳۲
۲	۱۱/۲٤±۲/۷۷
۱۰	۱۷/۳۸±٤/۸۵
۲۰	۱۸/۵۵±٤/۱۹

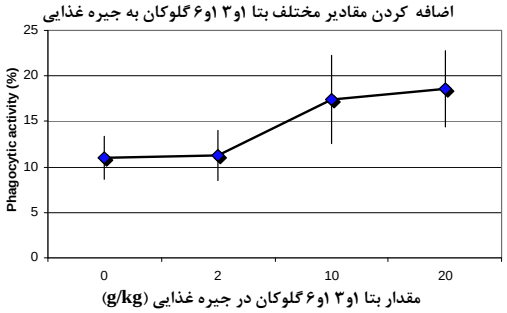
جدول شماره ۱۷- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی برحسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)



نمودار شماره ١٤- پروتئین پلاسمای کل(mg/ml) در میگوی سفید هندی بر حسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)

مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)	پروتئین پلاسمای کل(mg/ml)
شاهد	٧٤/۲۲±۱۳/۹٦
۲	٧٦/۷۵±۱٤/۸۹
۱۰	۱۰۸/٤۹±۱٦/٤٤
۲۰	۱۱۳/٦٦±۱۸/۸٤

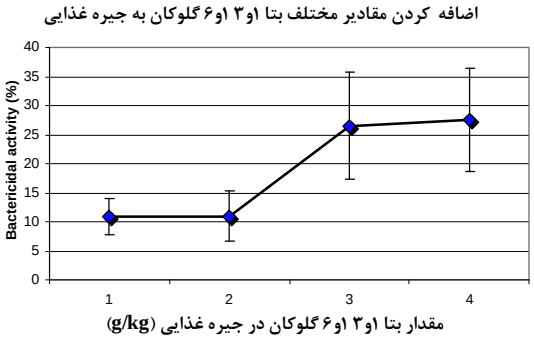
جدول شماره ۱۸- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی بر حسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)



نمودار شماره ۱۵- فعالیت فاگوسیتی (درصد) در میگوی سفید هندی بر حسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)

مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)	فعالیت باکتری کُشی (درصد)
شاهد	۱۰/۸۹±۳/۱۰
۲	۱۱/۰۰±٤/۳۸
۱۰	۲٦/۵۵±۹/۲۰
۲۰	۲۷/۵۵±۸/۸٦

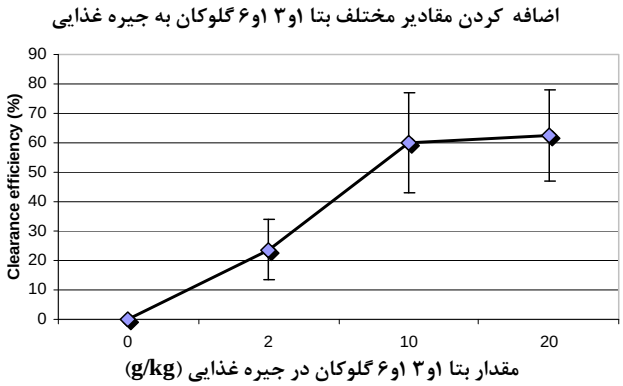
جدول شماره ۱۹- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی بر حسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)



نمودار شماره ١٦- فعالیت باکتری کُشی (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)

مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)	فعالیت باکتری کُشی (درصد)
شاهد	-
۲	۲۳/۵۵±۱۰/۲۳
۱۰	٦۰/۱۱±۱٦/۸۷
۲۰	٦۲/۵۵±۱۵/۳۹

جدول شماره ۲۰- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی بر حسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)



نمودار شماره ۱۷- توانایی حذف باکتری (درصد) در میگوی سفید هندی برحسب مقادیر بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان موجود در جیره غذایی(g/kg)

تغذیه با جیره حاوی بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان (g/kg)	تعداد میگوها	زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)، میزان بازماندگی (درصد) و تعداد میگوهای زنده در هر تکرار										
		٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤
شاهد منفی (saline)	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
شاهد مثبت (virus)	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۳±۵/۸ (۹، ۹ و ۱۰)	۹۰/۰ ±۰/۰ (۹، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۹)	۸۳/۳±۵/۸ (۹، ۸ و ۸)	۸۰/۰±۱۰/۰ (۹، ۸ و ۷)
۲	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۱۰، ۱۰ و ۹)	۹۰/۰ ±۰/۰ (۹، ۹ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۹)	۸۶/۷±۵/۸ (۹، ۸ و ۹)
۱۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۳/۳±۵/۸ (۹، ۹ و ۱۰)	۹۳/۳±۵/۸ (۹، ۹ و ۱۰)	۹۰/۰ ±۱۰/۰ (۸، ۹ و ۱۰)
۲۰	۳×۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)	۹۶/۷±۵/۸ (۹، ۱۰ و ۱۰)

جدول شماره ۲۱- میزان بازماندگی میگوهای سفید هندی *(Fenneropenaeus indicus)* مواجهه داده شده با ویروس لکه سفید، پس از ١٤ روز تغذیه با غذای کنسانتره حاوی مقادیر مخلف بتا ۱و۳ ۱و٦ گلوکان.

در میگوهای گروه شاهد منفی که به مدت دو هفته با غذای فاقد بتاگلوکان تغذیه شدند و در پایان این مدت بجای سوسپانسیون ویروسی،۰/۱ میلی‌متر سرم فیزیولوژی استریل به آنها تزریق شد، تا پایان دوره ۱۴ روزه پس از تزریق سرم فیزیولوژی استریل، تلفات مشاهده نشد ولی در گروه شاهد مثبت که به مدت دو هفته با جیره غذایی فاقد بتا گلوکان تغذیه شدند و پس از پایان این مدت ۰/۱ میلی‌متر از سوسپانسیون ویروسی تهیه شده به آنها تزریق شده، از روز دهم تلفات مشاهده شد.در پایان دوره ۱۴ روزه پس از تزریق سوسپانسیون ویروسی، میانگین بازماندگی در گروه شاهد مثبت و تیمارهای ۲،۱۰ و ۲۰ گرم بر کیلوگرم بترتیب به ۱۰/۰±۸۰/۰، ۵/۸±۸۶/۷، ۱۰/۰±۹۰/۰ و ۵/۸±۹۶/۷ درصد رسید. آنالیز ANOVA یک طرفه اختلاف معنی داری را پس از گذشت دوهفته از تزریق سوسپانسیون ویروسی،بین مقادیر بدست آمده نشان داد($p > 0.05, df = 14$).

٤- بحث و نتیجه گیری

میگوها مانند سایر بی مهرگان، بمنظور دفاع ومقابله دربرابر یک عفونت، کاملاً به سیستم ایمنی غیر اختصاصی خود وابسته هستند وفاقد حافظه ایمنولوژیک شناخته شده درمهره داران می باشند. ازاین رو بنظر نمی رسد که واکسن بتواند میگوها را در برابر یک بیماری حساس نماید.به رغم این موضوع، پرورش دهندگان میگو به تجربه دریافته اند که پس از وقوع یک بیماری ویروسی اولیه دراستخر های پرورش میگو و مشاهده میزان مرگ ومیر بالا، میگو های مزارع آلوده، مقاومت اختصاصی بالایی دربرابر آن ویروس خاص بدست می آورند. این مکانیزم ایمنی اختصاصی گرچه وابسته به ایمونوگلوبولین ها تشخیص داده نشده است، ولی دارای حافظه ایمونولوژیک کوتاه مدت بوده و زمینه بسیار مهمی برای تحقیق درباره ایمنی اختصاصی دربرابر بیماری ها، درمیگو می باشد. تحریک کننده های سیستم ایمنی ترکیبات شیمیایی هستند که هموسیت ها را فعال کرده و بنابراین جانوران را در برابر عفونت های ایجاد شده توسط ویروس ها، باکتریها، قارچ ها و انگل ها مقاوم می‌نماید(Bachère, 2000).

همزمان با افزایش دانش ما در مورد رابطه بین شرایط محیطی و بیماری، سیستم های مدیریتی اهمیت بیشتری را به پارامترهای محیطی دادند ولی علی رغم اعمال مدیریت های بهداشتی کامل، برخی از استرسها مثل استرس هنگام انتقال لاروهای میگو از هچری به مزرعه اجتناب ناپذیر می باشد. علاوه بر این میگوها ممکن است در مزرعه تحت تأثیر استرس هایی بر اثر شرایط آب و هوایی و یا مشکلات پیش بینی نشده ای در آب ورودی قرارگیرند. در حال حاضر در چنین شرایطی، پرورش دهندگان میزان غذادهی را کاهش داده و با تجویز آنتی‌بیوتیک تلاش می کنند که میزان باکتریهای فرصت طلب در استخر را کاهش دهند. در این وضعیت ترجیح داده می شود که مکانیسم دفاعی موجود در بدن میگو را به گونه ای بهینه کرد که بتواند به خوبی در برابر عفونت های فرصت طلب مقاومت نماید. برای کارآمد بودن هر روش کنترلی در مدیریت بیماری باید بکارگیری آن روش بخشی از سیستم مدیریت بهداشتی جامعی باشد که در استخر اعمال می شود. برخی از سیستم های موجود پیشرفته بوده و نیاز به امکانات عالی و اکولوژیک مناسبی دارند. محرک های سیستم ایمنی می‌توانند نقش مهمی در چنین سیستمهایی بازی کنند.

مطالعات وسیعی بر روی گونه های مختلف جلبک های قرمز و قهوه ای و تاثیر عصاره حاصل از این جلبک ها بر شاخص های خونی- ایمنی و افزایش مقاومت گونه های مختلف ماهی و میگو در برابر بیماریهای باکتریایی و

ویروسی انجام گرفته است. یکی از جلبک هایی که علاوه بر پزشکی، در دامپزشکی و آبزی پروری نیز مورد توجه و بررسی قرار گرفته است، جنس *Sargassum* می باشد، از عصاره محلول در آب داغ این جلبک و سایر جلبک های قهوه ای، پلی ساکاریدِ سولفاته ای استخراج می شود که قند اصلی آن Fucose می باشد این قند یک منوساکارید غیر معمول است و بصورت ایزومر L-fucose در تعدادی از ترکیبات موکوپلی ساکاریدی و موکوپروتئینی حضور دارد (Zhu *et al.*, 2003). دو جنس *Sargassum* و *Padina* در بین جلبکهای قهوه ای موجود در سواحل استان بوشهر، بیشترین فراوانی را داشته و از این رو برای این مطالعه مورد نظر قرار گرفتند. در سال۱۹۹۸ Hashino و همکارانش از عصاره آب گرم *Sargassum horneri* پلی ساکارید سولفاته استخراج کردند که قند اصلی آن فوکوز است و دارای خاصیت ضد ویروس قوی بر علیه ویروسهای هرپس‌سیمپلکس تیپ‌یک، سیتومگالوویروس و ویروس ایدز می باشد نکته جالب توجه این است که برخلاف ترکیبات ضد ویروسی دیگر، این ترکیب علاوه بر مهار عفونت ویروسی در مراحل اولیه و جلوگیری از نفوذ و اتصال ویروس به داخل سلول، پس از ورود ویروس به سلول میزبان نیز اثر ضد ویروسی خود را اعمال می کند. مطالعات اخیر نشان می دهد که این ترکیبات سولفاته تاثیر بسیار خوبی در پیشگیری از عفونت های ویروسی میگو از جمله بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی دارد. نکته ای که باید در نظر داشت این است که مطالعات زیادی روی تغییر ترکیبات جلبکهای مختلف در فصول و شرایط متفاوت انجام شده است. این چنین مطالعاتی نیز باید پیرامون گونه های غالب خلیج فارس صورت پذیرد علاوه بر این با تهیه فراکسیونهای مختلف با روش HPLC ، باید تأثیر هرفراکسیون نیز ارزیابی گردد.

Itami و همکاران در سال ۲۰۰۲ از جلبک قهوه ای *Cladosiphan okamuranus*، فوکوئیدان استخراج کردند و از آن در تغذیه میگوی *Kuruma* استفاده کردند و ۴ روز پس از اولین سری غذا دهی، میگوها را در سوسپانسیونی از ویروس لکه سفید غوطه ور کردند و اعلام نمودند که دوز بالای فوکوئیدان در پیشگیری از بیماری لکه سفید ویروسی مؤثرتر می باشد. در مطالعه که توسط Chotigeat و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام پذیرفت اعلام شد که استفاده خوراکی از فوکوئیدان استخراج شده از جلبک *Sargassum polycystum* در کاهش ابتلاء میگوهای پرورشی به بیماری لکه سفید موثر است. Yeh و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از عصاره آب گرم جلبک *Sargassum duplicatum* به صورت غوطه وری و تزریقی برای تحریک سیستم ایمنی میگوی وانامی آلوده به *V.alginoliticus* استفاده کردند و سیستم ایمنی میگو را از طریق بررسی تعداد هموسیتهـــای کل، انفجار تنفسی،

سیتم پروفنل اکسیداز و فعالیت فاگوسیتی هموسیتها مورد مطالعه قرار دادند و بر اساس گزارش آنها عصاره این جلبک، سبب تحریک سیستم ایمنی و افزایش بازماندگی میگوهای آلوده در مقایسه با گروه شاهد می گردد. یافته های مطالعه حاضر با نتایج اعلام شده از سوی Yah و همکارانش مطابق دارد گرچه میزان افزایش فاکتورهای ایمنی تعیین شده اندکی کمتر از میزان تعیین شده توسط Yah وهمکارانش می باشد.

در دهه اخیر مطالعات زیادی درمورد بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان‌ها انجام شده است. Raa و همکاران در ۱۹۹۶ توانایی فعال کردن ماکروفاژها و افزایش سیستم غیر اختصاصی در حیوانات خونگرم، ماهیان و میگو را توسط این ترکیب بررسی نمودند آنها دریافتند که این ترکیب در ماهی ها بر خلاف لیپوپلی ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌ها، تأثیر مستقیمی بر لنفولیست‌های تولید کننده آنتی بادی نداشته و لذا موجب تحریک لنفوسیت‌ها و تولید آنتی بادی علیه خود بتا۱و۳ ۱و۶ گلوکان نمی‌شوند و از این رو توانایی جاندار را با تولید آنتی بادیها به هدر نمی‌دهند. مطالعات نشان می‌دهد که بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان خالص بسیار هدفمند عمل کرده و بصورت اختصاصی بر ماکروفاژها، گرانولوسیت و سلولهای کشنده طبیعی (NK-Cellها) تأثیر می‌گذارد (Engstad, 1994; Engstad & Robertsen 1993; Engstad & Robertsen 1994). در مطالعه ای که توسط Nicoletti و همکاران در سال ۱۹۹۲ صورت پذیرفت، مشخص گردید بدلیل واکنش بسیار دقیق بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان‌با گیرنده‌های موجود بر روی سلولهای فاگوسیت کننده، حتی در صورت تزریق این ترکیبات به جانوران تحمل خوبی از طرف جانوران دیده می‌شود و هیچگونه واکنش‌های آلرژیک و اثرات سمّی علیه بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان دیده نمی‌شود. . در سال ۲۰۰۳ Cheng و همکاران از بتا ۱و۳ گلوکان بصورت خوراکی برای بهبود سیستم ایمنی میگوی ببری سیاه آلوده به لکه سفید استفاده کردند. آنها بیان داشتند که تیمار خوراکی با بتا ۱و۳ گلوکا ن به میزان ۱۰ گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۰ روز، موجب افزایش معنی داری در توانایی سیستم ایمنی و بقای میگوی ببری سیاه آلوده به لکه سفید می شود. نتایج حاصل شده از مطالعه حاضر با یافته های Cheng و همکارانش مطابقت دارد.

در اکثر مطالعات انجام شده درمورد تأثیر فاکتورهای مختلف در شاخصهای ایمونولوژیک و فیزیولوژیک در سخت پوستان و به ویژه در میگوها، دو شاخصِ تعداد هموسیت کل و میزان پروتئین کل پلاسما دارای بیشترین تغییرات بوده و آیینه تمام نمایی از برهمکنش جانور با محیط پیرامون خود و نشان دهنده وضعیت فیزیولوژیک جانور در پاسخ به استرس های مختلف محیطی می باشـــند (Sanchez *et al*,. 2001). از این رو محققیـــنِ مختلف

براساس یافته های چند ساله خود در خصوص هر گونه از میگوهای پرورشی، اقدام به تعیین دامنهٔ قابل قبول برای این دو شاخص نموده اند و بر اساس آن بجای بیان کیفیِ *وضعیت سلامتی* میگوها، از این دو شاخصِ کمّی استفاده می نمایند. گرچه نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات مشابه همخوانی دارد و لی مشاهده می شود که در بعضی موارد میزان شاخص های ایمنی اندازه گیری شده در میگوهای شاهد، کمتر از موارد گزارش شده در مطالعات مشابه می باشد. با توجه به انجام مکرر و دقیق پروتکل مربوط به هر کدام از این روش ها، می توان به این نتیجه رسید که برخی از فاکتورهای فیزیکی یا شیمیایی مانند شوری، بعنوان یک *استرس* بر فرآیندهای فیزیولوژیکِ سازش پذیری و سازگاری جانور با محیط پیرامون خود اثر گذاشته و موجب بروز چنین کاهشی شده اند. اگرچه در طول انجام آزمایش تلاش شد که فاکتورهای قابل کنترل مانند شوری، اکسیژن، دمای آب و دمای هوای سالن، رژیم نوری و مرحلهٔ پوست اندازی (Rodrıguez and moullac, 2000) ثابت و یکسان باشد. باتوجه به اینکه شوری آب دریا در سواحل استان بوشهر در حدود ۴۰ قسمت در هزار می باشد، در مراحل اجرایی این پروژه نیز از آب فیلتر شدهٔ دریا با همان شوری طبیعی استفاده گردید تا با اطمینان بیشتری بتوان نتایج بدست آمده را به شرایط طبیعیِ منطقه تعمیم داد. این میزان شوری (۳۸ تا ۴۱ قسمت در هزار) خود بعنوان یک استرس محسوب می شود.

پوست اندازی پدیده ای است که در بسیاری از گونه های بی مهرگان از جمله سخت پوستان اتفاق می افتد. در این پدیده، پوسته فرسوده و قدیمی، از بدن جانور جدا شده و کوتیکول نو جایگزین آن می شود. این پدیده برای رشد پست لاروها در تمامی مراحل زندگی، فرآیندی ضروری می باشد. در یک جانور سالم چرخه پوست اندازی چندین بار در طول حیات آن انجام می شود، تا جانور بتواند رشد نماید. در روند پوست اندازی تغییرات معنی داری در ساختار بدن، فیزیولوژی، بیولوژی و رفتارشناسی جانور مشاهده می شود، لذا در مطالعات فیزیولوژیک و سیستم ایمنی از میگوهایی استفاده می شود که در یک مرحله پوست اندازی باشند. معیارهای گوناگونی بمنظور مرحله بندی فرآیند پوست اندازی مورد استفاده قرار گرفته است، ولی آنچه که امروزه به آن بیش از سایر مطالعات استناد می شود تغییر در بخش های زاینده خارها (Drach, 1963) می باشد. در این مطالعه نیز از کلید تصویری ارائه شده در مطالعه Promwikorn (۲۰۰۴) که بر اساس معیار های بیان شده توسط Drach تهیه شده است. با توجه به ثبات بیشتر فاکتورهای

فیزیولوژیک و ایمنی در مرحله C پوست اندازی(Chen and Cheng, 1993) ، در این مطالعه نیز از میگوهایی که در مرحله C یعنی مرحله بین دو پوست اندازی استفاده گردید.

علاوه بر موارد ذکر شده، به این مطلب نیز باید توجه نمود که جلبکها توانایی جذب و تجمع بیولوژیک برخی مواد و فلزات سنگین مانند سرب، کادمیوم، مس، نیکل و جیوه را دارا بوده و می توانند اشکال گوناگون فلزات سنگین را از طریق متیلاسیون جذب نموده و آنها را از محیط حذف نمایند(Tsui *et al*., 2006 and Freitas, *et al.*, 2008) . مطالعاتی فراوانی بر روی این دو گونه جلبک بعنوان شاخص زیستی فلزات در داخل (برخوردار و غیاث الدین۱۳۸۳؛ سعیدی و همکاران ۱۳۸۶) و خارج از کشور(Zolotukhina and Radzhinskaya, 1995; Dulymamode *et al.*, 2001) انجام شده است. با توجه به اثرات نامطلوب و اثبات شده فلزات سنگین، بر کارآیی سیستم ایمنیِ میگوهای پرورشی (Lorenzon *et al.*, 2001)، و با توجه به نتایج حاصل از مطالعه امیدی در سال ۱۳۷۹که در آن میانگین سالانه سرب در آبهای ساحلی استان بوشهر را ۳/۲۵ میکروگرم در لیتر اعلام کرده است، در این مطالعه اقدام به اندازه گیری میزان فلز سرب در عصاره آب گرم تهیه شده از هر دو جلبک سارگاسوم و پادینا گردید. در مطالعه Lorenzon و همکاران تأثیر مواجهه کوتاه مدت (۹۶ ساعت) با فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه آنها مشخص شد که غوطه‌ور ساختن میگوهای *Palaemon elegans* در آب دریای حاوی حاوی جیوه، کادمیوم، مس، کروم، روی و سرب به مدت ۸ ساعت، موجب کاهش در تعداد هموسیتها (هموسایتوپنی) می شود. البته آنها اعلام نمودند که پس از ۱۶ ساعت غوطه وری تعداد هموسیتها به زمان صفر یعنی به مقدار اولیه بازگشت. علاوه بر این آنها بیان کردند که فلز سرب بیشترین تأثیر را در کاهش تعداد هموسیتهای موجود در گردش هموسیتی داشته (دلیل اندازه گیری سرب در جلبکهای مورد آزمایش در بررسی حاضر) و پس از آن بترتیب روی، جیوه، کروم و کادمیوم در این خصوص موثر هستند. نتایج اندازه گیریهای انجام شده در آزمایشگاه بهار افشان تهران و به روش Nadafi *et al*., 2007 نشان داد که میزان تجمع فلز سرب در جلبکهای *S.glaucescens* و *P.boergeseni* بترتیب۲۲/۳ و۱۵/۷ میلی گرم بر گرم می باشد.

به دلیل در اختیار نداشتن فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد، امکان فعال نگهداشتن ویروس لکه سفید در لاشه میگوهای تلف شده ای که تست PCR آنها مثبت بود، برای مدت بیش از ۳ هفته در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، میسر نبود و لذا در هر مورد قبل از استفاده از لاشه ها جهت تهیه سوسپانسیون ویروسی، در ابتدا عضله و محتویات سفالوتوراکس لاشه های فریز شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، یخ زدایی شـده و برای تغذیـه

میگوهای استرس دیده ای که در یک اکواریوم مجزا نگهداری می شدند، استفاده می شد و پس از بروز علائم و ایجاد تلفات، از لاشه میگوهای تلف شده برای تهیه سوسپانسیون ویروسی استفاده می گردید. با توجه به عدم وجود اختلاف معنی دار بین شاهد منفی و مثبت در بررسی تاثیر عصاره جلبک *P.boergeseni* و بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان، بر میزان بازماندگی میگوها، بنظر می رسد انجام مکرر این عمل و نگهداری لاشه میگوهای مبتلا به بیماری لکه سفید در دمای ۲۰- درجه‌سانتیگراد، موجب پیدایش نوعی سازگاری بین سوش مورد استفاده و میگوی سفید هندی و همچنین کاهش قدرت بیماریزایی ویروس شده است. لذا به رغم نظر مشاورین محترم و مجری این پروژه مبنی بر تمدید زمان اجرا بمنظور تهیه نمودن ویروس فعال لکه سفید و تکرار مراحل پایانی، بدلیل عدم موافقت سازمان محترم تحقیقات و آموزش وزارت جهادکشاورزی، فاز پایانی این پروژه نیز با سوش موجود انجام شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غوطه ور ساختن میگوهای سفید هندی در ۳۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره آب گرم جلبک *S.glaucescens* یا *P.boergeseni* به مدت ۲ الی ۳ ساعت، یا تغذیه کردن میگوها با جیره غذایی حاوی ۱۰ گرم بر کیلوگرم بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان در افزایش THC، TPP، فعالیت فاگوسیتوزی، فعالیت باکتری کُشی و توانایی حذف باکتری مؤثر باشد. علاوه بر این غوطه وری به مدت ۳ ساعت در ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر از عصاره جلبک *S.glaucescens* ، در افزایش میزان بازماندگی میگوهای سفید موثر است. برای اظهار نظر در مورد تاثیر غوطه وری در عصاره جلبک *P.boergeseni* و همچنین تاثیر استفاده خوراکی از بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان بر افزایش میزان بازماندگی و پیشگیری از بیماری لکه سفید، به تکرار مطالعه با سوش فعال ویروس لکه سفید نیاز می باشد.

پیشنهادها

۱. همانطور که در بخش بحث و نتیجه گیری بیان شد، می توان از دو شاخص کمّیِ THC و TPP بعنوان شاخص های سلامتی استفاده کرد. لازمه این کار این است که تعیین میزان این دو شاخص در تمامی پروژه های مربوط به بخشهای تکثیر و پرورش و بهداشت و بیماریهای میگو الزامی شده، تا با جمع آوری و تعیین دامنه مناسب برای هر یک از این فاکتورها با شاخص های فیزیکی و شیمیایی و شرایط محیطی منطقه، بتوان از این شاخصها با ضریب اطمینان بیشتری بهره برد.

۲. مطالعات وسیعی بر روی اثرات تغذیه ای جلبک های قهوه ای در خارج از کشور انجام شده و تأثیرات استفاده خوراکی از عصاره های آب گرم، اتانولی و بیوماس خشک این جلبکها، بر روی جانوران و آبزیان مختلف که ارزش صنعتی دارند مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به همجواری کشور ما با خلیج فارس و امکان بهره برداری صحیح از این منبع غذایی ارزشمند و با توجه به تأثیرپذیری جلبک ها از محیط اطراف و تغییر در محتویات آنها در شرایط گوناگون، انجام مطالعات بیشتر بر روی تاثیر عصاره های مختلف جلبکها بر میگوهای پرورشی سودمند می باشد.

۳. انجام تیمارهای غوطه وری برای میگوهای مولد امکانپذیر می باشد و با توجه به بروز مرگ و میر در لاروهای ذخیره شده در استخر های پرورشی پس از گذشت هفته سوم از ذخیره سازی، بررسی امکان استفاده خوراکی از عصاره های این جلبک ها در جیره غذایی مورد استفاده در ماه اول پرورش و ارزیابی میزان تأثیر آن بر شاخص های سلامتی، سیستم ایمنی و پیشگیری از بروز بیماری ضروری می نماید.

۴. این پروژه در اواسط سال ۱۳۸۵ آغاز گردید و در آن زمان علی رغم تمام تلاشها، خریداری بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان در کشور میسر نشد و پس از هماهنگی با سازمان دامپزشکی کشور و اطمینان از عدم واردات این ترکیب و درنتیجه ممکن نبودن تهیه این ترکیب در داخل کشور نسبت به تهیه و انتقال این ترکیب از خارج از کشور اقدام گردید که با تلاش اینجانب و پیگیریها و مساعدتهای جناب آقای دکتر شریف پور و همکار محترم ایشان جناب آقای دکتر حاجی زاده که در کشور انگلستان مشغول به تحصیل بودند، این مهم با مشکلات فراوان امکان پذیر گردید و دارو از نمایندگی شرکت **WPS** در بیرمنگام انگلستان ابتیاع شد.

خوشبختانه در سال ۱۳۸۶ استخراج بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان از مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و زیر نظر آقای دکتر خسروی انجام گرفته است. با توجه به بومی شدن استخراج این ترکیب، انجام بررسی های کاملترو دقیق تر بر روی اثرات این ترکیب بر فیزیولوژی و سیستم ایمنی میگوهای پرورشی ارزشمند می نماید.

۵. انجام بررسی های کامل و دقیق بر روی میزان فعالیت های ضد باکتریایی و ضد قارچی و در صورت امکان ضد ویروسی عصاره های مختلف جلبک های حاشیه خلیج قارس می تواند در انتخاب یک ترکیب ضدعفونی کننده کمک کننده باشد.

واژه نامه

تعداد هموسیت کل ..... THC,Total haemocyte Count .

میزان پروتئین کل ..... TPP, Total Plasma Protei ..

بیماری لکه سفید ..... WSD, White Spot Diseas….. .....

ویروس سندروم لکه سفید ..... WSSV, White Spot Syndrom Virus

پروتئین‌های تشخیص الگو .... PRP, Pathern Recognition Protei

پروفنل اکسیداز ..... proPO, pro Phenol Oxidease

فعال کننده پروفنل اکسیداز ..... PPA, Pro PhenolOxidase Activator .....

لیپوپلی ساکارید ..... LPS, LipoPolySaccharide…… .....

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ..... PCR, Polymerase Chain Reaction

محیط کشت مایع تریپتیک سوی ..... TSB, Tryptic Soy Broth

محیط کشت جامد تیوسولفات صفرا سوکوروز آگار ..... TCBS, ThioSulphate Bile Soucrose Agar .....

محلول هاروالد ..... VHS, Van Harrevald's Solution..... .....

درجه آزادی ..... *df*, degree of freedom

سلول کشنده طبیعی ..... NK cell, Natural Killer Cell

تشکرو قدر دانی

از کلیه همکاران مؤسسه تحقیقات شیلات ایران آقایان دکتر عیسی شریف پور و دکتر مصطفی شریف روحانی که با راهنمایی های خردمندانه خود به انجام هر چه بهتر این پروژه کمک کردند وآقای دکتر علی حاجی زاده برای همکاری در تهیه بتا ۱و۳ ۱و۶ گلوکان از کشور انگلستان صمیمانه تشکر نموده و از تمامی همکاران پژوهشکده میگوی کشور بویژه خانم ها فاطمه محسنی زاده و پریسا حسین خضری و آقایان قاسم غریبی، نظرا... فاطمی، رسول حاجی زاده، سیاوش صفرپور، مهران ارشد و حسین رشید زاده که زحمات زیادی را در عملیاتی شدن این پروژه متقبل شدند تشکر و سپاسگزاری می شود و همچنین یاد و خاطره دوست و همکار پرتلاش خود، در پژوهشکده میگوی کشور، مرحوم مختارحق نجات را گرامی می داریم. از آقای مهندس قرنجیک، همکار ارجمند در مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، که تعیین گونهٔ جلبکهای مورد بررسی را انجام دادند و از دکتر افتخاری و پرسنل تلاشگر ایشان در شرکت پژوهشی تولیدیِ بهار افشان تهران که در عصاره گیری، لئوفلیزاسیون و تعیین میزان فلزات سنگین در عصاره جلبکی بدست آمده همکاری نمودند، قدردانی می شود.

منابع

۱. امیدی، س. ، ۱۳۷۹، بررسی میزان فلزات سنگین در آبهای ساحلی استان بوشهر. مجله علمی شیلات، سال نهم، شماره ۳، صفحات ۳۵ تا ۴۸.

۲. برخوردار، ب. غیاث الدین، م. ، ۱۳۸۳، بررسی ظرفیت جلبک سارگاسوم در جذب کروم، نیکل و مس. زیست علوم و تکنولوژی محیط، شماره ۲۱، صفحات ۱۱ تا ۱۹.

۳. سعیدی، ر. ندافی،ک. نبی زاده نودهی، ر. ، ۱۳۸۷، بیوجذب سرب (II) و کادمیوم (II) از محیط های آبی بوسیله جلبک قهوه ای سارگاسوم مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، جلد ۲، شماره ۵، صفحات ۱۳ تا ۲۴.

4. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from sargassum linifolium., Carbohydrate Research , Volume 33, Issue 1, Pages 9-17.

5. Acharya S., J. Mohanty J., Sahoo P.K., (2004), Humoral defence factors in Indian river prawn, Macrobrachium malcolmsonii. Fish & Shellfish Immunology 17, 137-147

6. Albore F. V. and Plascencia G.Y., 2000, Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response., Aquaculture Volume 191, Issues 1-3, Pages 13-21 .

7. Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Ann. Rev, of Fish Dis.* 2: 28 1-307.

8. Bachère, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191, 3-11.

9. Barkhordar, B. and Ghiasseddin M., 2004, The study of Sargassum capacity to adsorb Cr, Ni and Cu., J.Env.Sci. Tech., No.21.

10. Bauchau, A. G. (1981). Crustaceans. In: Ratcliffe N. A. and Rowley, A. F. (editors). Invertebrate blood cells. Academic Press, London and New York, pp. 385-420.

11. Bilan M. I.; Grachev A. A.; Ustuzhanina N. E.; Shashkov A. S.; Nifantiev N. E. and Usov A. I., 2004, A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed Fucus distichus L., Carbohydrate Research Volume 339, Issue 3, Pages 511-517.

12. Brandtzaeg, P. (1996). Development of the mucosal immune system in humans. In: *Recent Developments in infant nutrition.* (Eds. Bindels,J.G., Goeedhart, A.C. and Visser, H.K.A.). Kluyver Academic Publishers, London; 349-376.

13. Chen, J.C., Cheng, S.Y., (1993). Studies on hemocyanin and haemolymph proteins levels of *Penaeus japonicas* based on sex, size and moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 106 _2.293–296.

14. Cheng W., Hung-Tien Chieua, Chiung-Hui Tsaia and Jiann-Chu Chen (2005) ;Effects of dopamine on the immunity of white shrimp Litopenaeus vannamei . Fish & Shellfish Immunology, Vl1, Issue 4, pp. 375-385.

15. Chotigeat W.; Tongsupa S.; Supamataya K. and Phongdara A.2004, Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp., Aquaculture Volume 233, Issues 1-4, Pages 23-30.

16. Davina, 1. H. M., Rijkers, G. T., Rombout, J. H. W. M., Timmermans, L. P. M. and van Muiswinkel, W. B. (1980). Lymphoid and non-lymphoid cells in the intestine of cyprinid fish, p. 129-140. In: *Development and differentiation of vertebrate.*

17. de Felippe, J., da Rocha e Silva, M., Maciel, F. M. B., de Macedo Soares, A. and Mendes, N. F. (1993). Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3 polyglucose (Glucan). *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 177: 383-388

18. Destoumieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachère, E. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science 113, 461-469.

19. Doggett, T. A. and Harris, 1. E. (1987). The ontogeny of gut-associated lymphoid tissue in *Orechromis mossambicus.* J. Fish Biol. 31, suppl. A: 23-27.

20. Duarte M. E. R.; Cardoso M. A. ; Noseda M. D. and Cerezo A. S.,2001, Structural studies on fucoidans from the brown seaweed Sargassum stenophyllum., Carbohydrate Research, Volume 333, Issue 4, Pages 281-293.

21. Dulymamode, R. Sukhoo, N. Bhugun, I. (2001)**.** Evaluation of *Padina boergesenii* (Phaeophyceae) as a bioindicator of heavy metals. South African Journal of Botany. 67, 3: 460- 464.

22. Dunn, E. J., Polk, A., Scarrett, D. J., Olivier, G., Lall, S. and Gossen, M. F. A. (1990). Vaccines in aquaeulture: The search for an efficient delivery system. *Aquacultural Engineering* 9: 23-32.
23. Engstad, R. (1994): Yeast B-gluean as an immunostimulant in Atlantic salmon *(Salmo salar* L.). Biological effects, recognition and structural aspects. *Dr. Sc. thesis.* The Norwegian College of Fishery Science, University of Tromst~, Norway.
24. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1993). Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 3 19-330.
25. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1994). Specificity of a 3-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon *(Salmo salar* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 18, no. 5: 397-408.
26. Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W. and Warr, G. W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp,Litopenaeus vannamei, and the Atlantic white shrimp, L. setifirus. Developmental and Comparative Immunology 25, 565-577.
27. Hall, M. R. and Van Ham, E. H. (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant black tiger prawn *Penaeus monodon*. Journal of the World Aquaculture Society 29, 290-299.
28. Hart, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E. and Grayson, T. H. (1988). Gut immunology in fish: A review. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 453-480.
29. Hernandez-Lopez J., Gollas-Galvan T., Vargas-Alborse F., 1996. Activation of the phenoloxidase system of the brown shrimp *(Penaeus californiensis* Holmes*)*. Comperative Biochemistry And Physialogy; 17:349-55.
30. Hoshino T., et al., An antiviral active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*., C.Agard Biol pharm Bull., 1998., 21, pp: 730-734.
31. Itami T., 2002, Promising strategies against WSSV for kuruma shrimp in Japan., SEAFDEC Asian Aquaculture., Volume XXIV Number 3.
32. Itami, T., Asano, M. Tokushige, K., Kubono, K. Nakawaga, A., 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral adminestration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164, pp: 277-288.
33. Jeney, G. and Andersen, D. P. (1993). Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhances the non-specific defense mechanisms in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss). Aquaculture* 116: 3 15-329.
34. Jiang, G., Yua R., Zhoua M., (2004). Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of Penaeus japonicus to virulence of white spot syndrome virus. Aquaculture 241, 61-75.
35. Johnson, R.W.(l997). Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated review. *J. Anim. Sci.*, 75: 1244-1255.
36. Kanost, M. R. (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Developmental and Comparative Immunology 23, 291-301.
37. Kidchakan, S. and Juadee, P. (1998). The effect of MacroGard on growth, feed conversion, survival and immune response of black tiger shrimp, *Penaeus monodon.* Printed report from Prince of Songkhla University, Dep. of Aquatic Science, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.
38. Kidchakan, S. and Juadee, P. (1998). The effect of MacroGard on growth, feed conversion, survival and immune response of black tiger shrimp, *Penaeus monodon.* Printed report from Prince of Songkhla University, Dep. of Aquatic Science, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.
39. Kidchakan, S. and Juadee, P., (2003). Morphology and immunological roles of hemocytes and fixed phagocytes in Black Tiger Shrimp, Penaeus monodon, Fish Pathology, 38 (2), pp: 33-39.
40. Klein J. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist. Scand Journal Immunol 1997; 46:558–64.
41. Kopacek, P., Grubhoffer, L. and Sderhلll, K. (1993). Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish Pacifastacus leniusculus. Developmental and Comparative Immunology 17, 407-418.
42. Liu C.H, Chen J.C, 2004. Effect of ammonia on the immune response of white rimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish immunology, 16:321-34.
43. Lorenzon S., Francese M., Smith V.J. and Ferrero E.A. (2001), Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. Fish & shellfish immunology 11, 459-472.
44. Maeda, Y., Yonekawa, H. and Chihara, U. (1994). Application of Lentinan as Cytokine Inducer and Host Defense Potentiator in Immunotherapy of Infectious Diseases. In: *Immunotherapy of Infections.* Ed. Noel Masihi. Nato copyMarcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
45. Millar, D. A. and Ratcliffe, N. A. (1994). Invertebrates. In: Turner, R. J. (editor). Immunology, a comparative approach. John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 29-68.
46. Munoz, M., Cedeno, R., Rodriguez, J., Van der Knaap, W. P. W., Mialhe, E. and Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, Penaeus vannamei. Aquaculture 191, 89-107.

47. Newman S.G., 1999, A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference October 28-30.
48. Nieoletti, A., Nicoletti, U., Ferraro, U., Palmieri, U., Mattaboni, P. and Uermogli, R. (1992). Preliminary Evaluation of Immunoadjuvant Activity of an Orally Administered Glucan Extracted from *Candida albicans. Arzneim - Forsch./D rug Res.* 42(11). 10
49. Naddafi K., Ramin Nabizadeh R., Reza Saeedi R., Mahvi A.H., Vaezi F., Yaghmaeian K., Ghasri A., Nazmara S. (2007). Biosorption of lead (II) and cadmium (II) by protonated *Sargassum glaucescens* biomass in a continuous packed bed column. Journal of Hazardous Materials 147, pp. 785–791.
50. Promwikorn W., Kirirat P. and Thaweethamsewee, P., 2004. Index of molting staging in black tiger shrimp *(Penaeus monodon)*, Songklanakarin J. Sci. Technol., 26(5): 765-72.
51. Raa, J. (1996). The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. *Reviews in Fisheries Science,* 4(3): 229-288. CRC Press.
52. Raa, J., Rtwstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B. (1992). The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: *Diseases in Asian Aquaculture* (I. M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthus, eds.), p. 39-50. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. *Res.* 42(11). Nr. 10
53. Robertson L, Bray W, Leung-Truillo J, Lawrence A., 1987, Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of World Aquaculture Society; 18:180-5.
54. Rodrıguez, J., Moullac G.L., (2000), State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191, 109–119.
55. Rombout, J. H. W. M., Bot. H.E. and Taverne-Thiele, J.J. (1989). Immunologic importance of the second gut segment of carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. *.1. Fish Biol.* 35: 167-178.
56. Rombout, J. H. W. M., Taverne-Thiele, J.J. and Villena, M.I. (1993). The gut-associated lymphoid tissue (UALT) of carp *(Cyprinus carpio* L.): An immunocytochemical analysis. Dev. Comp. Immunol. 17: 55-66.
57. Sanchez, A., Pascual, C., Sa´nchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in Litopenaeus setiferus adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198, 13– 28.
58. Schwab. J.H. (1993). Phlogistic properties of peptidoglycan-polysaccharide polymers from cell walls of pathogenic and normal-flora bacteria which colonize humans. *Infection and Immunity,* Vol 61, No 11, pp: 535-4539.
59. Shoenherr, W. D., Pollman, D. S. and Coalson, J. A. (1994). Titration of MacroGard on growth performance of nursery pigs. *.1. Anim. Sci.* 72: Suppl. 1.
60. Siwicki, A.K., cossorini-Dunier M., 1990. Effect of Levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in Crap *(Cyprinus carpio*). Ann. Research Vet. , 21 (2), pp: 95-100.
61. Smets, P., Zalisz, R. and Boisnic, F. (1988). Biostim ® (RU 41740), immune functions and infection. *Advances in the Biosciences* 68: 85-102.
62. Soderhall, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases, 2, 3- 23.
63. Soderhall, K., Aspan, A. and Duvic, B. (1990). The proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. Research Immunology 141, 896-907.
64. Soderhall, K., Cerenius, L. and Johansson, M. W. (1996). The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: Sderhall, K., Iwanaga, S. and Vasta, G. R. (editors). New Directions in Invertebrate Immunology, SOS Publications, Fair Haven, pp. 229-253.
65. Song, Y. L. and Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (Penaeus monodon) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology 18, 201-209.
66. Song, Y-L. and Sung, H. H. (1990). Enhancement of growth in Tiger shrimp *(Penaeus monodon)* by baeterin prepared from *Vibrio vuln~ficus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*
67. Sritunyalucksana, K. and Sderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191, 53-69.
68. 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.
69. Sung, H.H., Chang, H.-J., Her, C-H., Chang, 1.-C. and Song, Y.-L. (1998). Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon and Macrobrachium rosenberghii. J. of Invertbrate Pathology* 71, 26-33
70. Takahashi, Y., Vehara, K., Watanabe, R., 1998. Efficacy of oral Adminestration of Fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling White Spot Syndrom in Kuruma in Japan, Advances in Shrimp Biotechnology, pp:171-173.
71. Thompson, A., White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture* 114:1-18.
72. Thompson, K. D., Cachos, A. and Jnglis, V. (1993). Jmmunomodulating effects of glucans in the presence of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss,* pp. 31. *Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture,* Phuket, Thailand.

73. Tristram, D. A. and Ogra, P. L. (1994) Immunology of the gastrointestinal tract. In: *Viral infections of the Gastrointestinal Tract* (A. Z. Kapikian, ed). Marcel Dekker Inc. New York (ISBN 0-8247-8860-5).
74. Tsui, M.T.K, Cheung K.C., Tam N.F.Y, WongM.H. (2006). A comparative study on metal sorption by brown seaweed. Chemosphere 65: 51–57.
75. Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture 191, 13-21.
76. Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of 1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology 116B, 453-458.
77. Verlhac, V., Obach, A. Gabaudan, J., Schuep, W. and Hole. R. (1998). Immunomoduiation of dietary vitamin C and glucan in rainbow trout *(Onchorhynchus mykiss). Fish and Sheliflsh Immunology,* 8, 409-424.
78. Yeh S.T., Lee C.S., Chen J.C., Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei.* Fish & Shellfish Immunology, In Press, Corrected Proof, Available online 7 July 2005.
79. Yeh, M. S., Chen, Y. L. and Tsai, I. H. (1998). The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. Comparative Biochemistry and Physiology 121B, 169-176.
80. Zhu W.; Ooi W. E. C.; Chan P. K. S.; and Ang P.O.,2003, Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity., NRC Canada.
81. Zhuang C.; Itoh H.; Mizuno T.; Ito H., 1995, Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*)., Biosci Biotechnol Biochem. 59(4):563-7.
82. Zolotukhina, E.Yu. and Radzhinskaya, N.V. (1995). Macroalgae as heavy metal monitors in Black Sea littoral ecosystems. OCEANOLOGY, English Translation 35, No, 3: 400-403.

Abstract

In this study two species of algae**,** *Sargassum glaucescens* and *Padina boergeseni* that found plenteously in Persian Gulf and Bushehr coast, were collected and hot water extracts of them were lyophilized. *F. indicus* (11.32±1.20 g), after two weeks adaptation in Shoghab research station were immersed in seawater (39 ppt and 25±1 °C) containing hot-water extract of each brown algae, *S.glaucescens* and *P.boergeseni,* at 100, 300 and 500 mg/l concentration, Survival rate and immunological parameters (total haemocyte count (THC), total plasma protein (TPP), Phagocytic activity, bacterial clearance efficiency and bactericidal activity) were examined. In addition effect of dietary administration of beta 1, 3 1, 6 glucan on prevention of White Spot Disease and immunological parameters of shrimp were investigated. According to results, immersion in seawater containing 300 and 500 mg/l concentration of algal hot-water extract after 2 and 3 hours or oral administration of beta 1,3 1,6 glucan at level of 10 g/kg diet for 14 days significantly enhanced THC, TPP, Phagocytic activity, bacterial clearance efficiency and bactericidal activity. Immersion in seawater containing 100, 300 and 500 mg/l hot-water extract of *S.glaucescens* after 3 hours, improved the survival rate of WSSV-infected *F. indicus.*