وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده میگوی کشور

عنوان :

بررسی اثرمکمل جلبکهای دریایی بر افزایش بازماندگی، رشد و سلامت میگوهای سفید غربی *Litopenaeus vannamei*

مجری :
عقیل دشتیان نسب

شماره ثبت
۴۸۷۳۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : بررسی اثرمکمل جلبکهای دریایی برافزایش بازماندگی، رشد و سلامت میگوهای سفید غربی *Litopenaeus vannamei*
شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۰۵-۱۲-۸۰-۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : عقیل دشتیان نسب
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : عقیل دشتیان نسب
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مصطفی شریف روحانی- بابک قائدنیا- مریم میربخش- وحید یگانه- عیسی کشتکار- محمدعلی نظاری- محمد افشارنسب- عباسعلی زنده بودی- محمد خلیل پذیر- غلامحسین دلیر پور- علی اسدی- مصطفی صبوحی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : محمدرضا مهرابی
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۸۹/۳/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی اثرمکمل جلبکهای دریایی برافزایش بازماندگی، رشد و سلامت میگوهای سفید غربی *Litopenaeus vannamei*

کد مصوب : ۸۹۱۰۵ -۱۲-۸۰-۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۷۳۱ تاریخ : ۹۴/۱۱/۱۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای عقیل دشتیان نسب دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۴/۸/۲۳ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای ا پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۳
۲- کلیات ۸
۱-۲- نگاه کلی بر جلبکهای دریایی ۸
۲-۲- مروری بر فعالیتهای بیولوژیک عصاره های جلبکی ۱۳
۳-۲-کاربرد جلبکهای دریایی در آبزی پروری ۱۷
۴-۲- غنی سازی آرتمیا ۱۹
۳- مواد و روش کار ۲۱
۱-۳- وسایل و مواد مورد نیاز ۲۱
۲-۳- تجهیزات و وسایل مورد نیاز ۲۱
۳-۳-روش کار ۲۲
۴-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره ها ۲۷
۵-۳- تعیین اثر آنتی اکسیدانی عصاره جلبکهای دریایی در شرایط برون تن ۲۹
۶-۳ - تهیه و غنی سازی آرتمیا ۳۰
۷-۳- تهیه و نگهداری بچه میگوها ۳۱
۸-۳- تعیین اثر عصاره جلبکهای منتخب بر کاهش بار آلودگی باکتریایی در شرایط درون تن ۳۲
۹-۳- تعیین درصد بقای بچه میگوها و فاکتورهای رشد ۳۵
۱۰-۳- آنالیز آماری داده ها ۳۶
۴- نتایج ۳۷
۱-۴- نتایج شناسایی و آماده سازی جلبکهای دریایی ۳۷
۲-۴- نتایج آزمونهای باکتری شناسی ۴۳
۳-۴- نتایج بررسیهای آنتی اکسیدانی ۵۰
۴-۴-نتایج LC_{50} عصاره جلبکها بر ناپلی آرتمیا ۵۶
۵-۴ - نتایج بار آلودگی ۵۷
۶-۴-نتایج رشد و بازماندگی ۵۸

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۷- نتایج LD_{50} ویبریو هاروی برای بچه میگوها ۶۰
۴-۸- نتایج آزمون‌های چالش با باکتری *V.harveyi* ۶۱
۵-بحث و نتیجه‌گیری ۶۵
۵-۱- فعالیت ضدباکتریایی ۶۵
۵-۲- فعالیت آنتی اکسیدانی ۶۸
۵-۳- رشد و بازماندگی ۷۲
۵-۴- مقاومت به ویبریوزیس ۷۷
۶-نتیجه گیری کلی ۷۹
پیشنهادها ۸۰
منابع ۸۱
چکیده انگلیسی ۹۰

چکیده

استفاده از آنتی بیوتیکها در آبزی پروری به دلیل اثرات بد جانبی مثل افزایش مقاومت میکروبی و بازمانده آنتی بیوتیکی محدود شده و دانشمندان به دنبال یافتن جایگزین هایی برای پیشگیری و کنترل بیماریهای آبزیان هستند. با توجه به غنی بودن جلبکهای دریایی از مواد غذایی و ترکیبات بیواکتیو، هدف از اجرای این تحقیق بررسی پتانسیل و امکان استفاده از جلبکهای بومی خلیج فارس در صنعت تکثیر و پرورش میگو به منظور بهبود کیفیت رشد، بازماندگی و مقاومت پست لاروهای میگو در برابر عوامل بیماریزا بخصوص ویبریوها می باشد. بدین منظور ۷ گونه جلبک دریایی پرسلولی از سواحل استان بوشهر از سه گروه عمده جلبکها شامل جلبکهای سبز (*C.iyengarii*)، جلبکهای قهوه ای (*Sargassum angustifolium* و *Sargassum ilicifolium*) و جلبکهای قرمز (*Gracilaria corticata*، *Kappaphycus alvarezii* و *Laurencia snyderiae*) جمع آوری و شناسایی شد. سپس عصاره های آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی از جلبکهای مذکور به روش خیساندن تهیه شد. در آزمایشگاه فعالیت ضدباکتریایی عصاره های مختلف جلبکها علیه باکتریهای گرم مثبت (*S.aureus* و *B.subtilis*) و گرم منفی (*V.harveyi*، *V.alginolyticus* و *E.coli*) به روش انتشار در آگار و بررسیMIC و MBC مورد ارزیابی قرار گرفت، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها نیز به روش حذف رادیکال آزاد DPPH و تعیین EC_{50} بررسی شد. براساس نتایج این دو آزمون به جز عصاره آبی که فعالیت آنتی باکتریالی کمی داشت ، سایر عصاره های چهار گونه از جلبکها به نامهای *S.angustifolium*، *L.snyderiae*، *K.alvarezii* و *G.corticata* جهت آزمایشات تجربی و استفاده در جیره غذایی بچه میگوها، به روش غنی سازی با آرتمیا (Bio-Encapsulation) انتخاب شدند. قبل از غنی سازی آرتمیا، اثر سمیت عصاره های مذکور از طریق تعیین LC_{50}، ۲۴ ساعته آنها برای ناپلی آرتمیا بررسی شد. از نتایج این بخش از پروژه، عصاره اتانلی برای غنی سازی ناپلی آرتمیا و استفاده در جیره غذایی بچه میگوها انتخاب شد. پس از غنی سازی ناپلی آرتمیا، توسط غلظتهای مختلف عصاره اتانولی جلبکهای منتخب، بچه میگوهای تهیه شده ($PL_{۲۲}$) در ۱۲ گروه و هر گروه با سه تکرار و ۱۰۰ عدد پست لارو در هر تکرار به نامهای کنترل منفی، کنترل مثبت، S(۲۰۰)، S(۴۰۰)، S(۶۰۰)،L(۲۰۰)، L(۴۰۰)، L(۶۰۰)، G(۳۰۰)، G(۶۰۰)، K(۳۰۰) و K(۶۰۰) تیماربندی شدند. تیمارهای کنترل منفی و کنترل مثبت از جیره غذایی پایه به علاوه آرتمیای غنی سازی نشده و تیمارهای مختلف علاوه بر جیره پایه از آرتمیای غنی سازی شده با غلظتهای مختلف عصاره اتانولی جلبکهای منتخب طی ۳۰ روز دوره پرورش استفاده کردند. به منظور ایجاد شرایط آلودگی مصنوعی همه تیمارها به جز کنترل منفی از روز اول ذخیره سازی به مدت ۳۰ دقیقه در معرض باکتری ویبریو هاروی با دز غیر کشنده $۱۰^{۷}$CFU/ml قرار گرفتند و پس از هر تعویض آب ۱۰ میلی لیتر از این دز به آب پرورش همه تیمارها به جز کنترل منفی اضافه می شد. پس از ۳۰ روز پرورش، درصد بازماندگی، وزن کسب شده و درصد نرخ رشد ویژه در گروههای مختلف بررسی شد. به منظور ارزیابی بار آلودگی ویبریویی، هر ۱۰ روز تعداد ۵ عدد پست لارو به صورت تصادفی از کلیه گروههای شاهد و تیمار نمونه گیری شده و مورد شمارش باکتریایی قرار می گرفتند.

نتایج آزمون نشان داد، بار آلودگی ویبریویی گروه کنترل منفی نسبت به همه گروهها کمتر بود و برعکس آن بار آلودگی در گروه کنترل مثبت نسبت به همه گروهها بیشتر بود. از میان سایر تیمارها بیشترین بار آلودگی متعلق به تیمار(۲۰۰)L با میانگین $۱۰^{۵}$×۰/۰۱± ۰/۵ کلنی در گرم بافت و کمترین آن متعلق به تیمار(۶۰۰)L با $۱۰^{۴}$×۰/۰۳± ۰/۶ کلنی در گرم بافت بود. نتایج بازماندگی نشان داد، پس از گروه کنترل منفی، بیشترین درصد بقا متعلق به گروه (۶۰۰)G با ۶/۶±۷۹/۴ درصد و پس از آن گروههای (۳۰۰)S و (۶۰۰)K با میزان به ترتیب ۷/۳±۷۳/۳ و ۶/۶±۷۰/۶ درصد بود که نسبت به گروه کنترل مثبت با درصد بقای ۶/۶±۳۳/۳ اختلاف معنی داری داشتند (P<۰/۰۱). این تحقیق همچنین نشان داد پارامترهای رشد در همه گروههای تیمار که از عصاره اتانولی جلبکهای مختلف با دزهای متفاوت استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت بهتر بود (P<۰/۰۵). پس از پایان دوره پرورش ۱۰ عدد از میگوهای باقیمانده هر تکرار را پس از ضد عفونی و شستشو، با همان نام ذخیره سازی شد، شرایط پرورش و تغذیه بدون افزودن باکتری به مدت ۱۰ روز دیگر ادامه پیدا کرد. پس از این ۱۰ روز کلیه تیمارها با دز کشنده *ویبریو هاروی* ($۳×۱۰^{۸}$cfu/ml) مواجه شدند. نتایج نشان داد، همه میگوهای کنترل منفی زنده ماندند، در مقابل بیش از ۹۰ درصد کنترل مثبت تلف شدند و کلیه بچه میگوهایی که از طریق آرتمیای غنی سازی شده غلظتی از عصاره اتانولی یکی از جلبکهای دریایی دریافت کرده بودند در مواجهه با باکتری تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند (P<۰/۰۱). این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی جلبکهای منتخب از خلیج فارس برای بهبود رشد، بازماندگی و کنترل بیماریهای میگو در مراکز تکثیر مفید است.

کلید واژه‌ها: جلبکهای دریایی، خلیج فارس، میگوی وانامی، رشد، بازماندگی، ویبریوزیس

۱- مقدمه

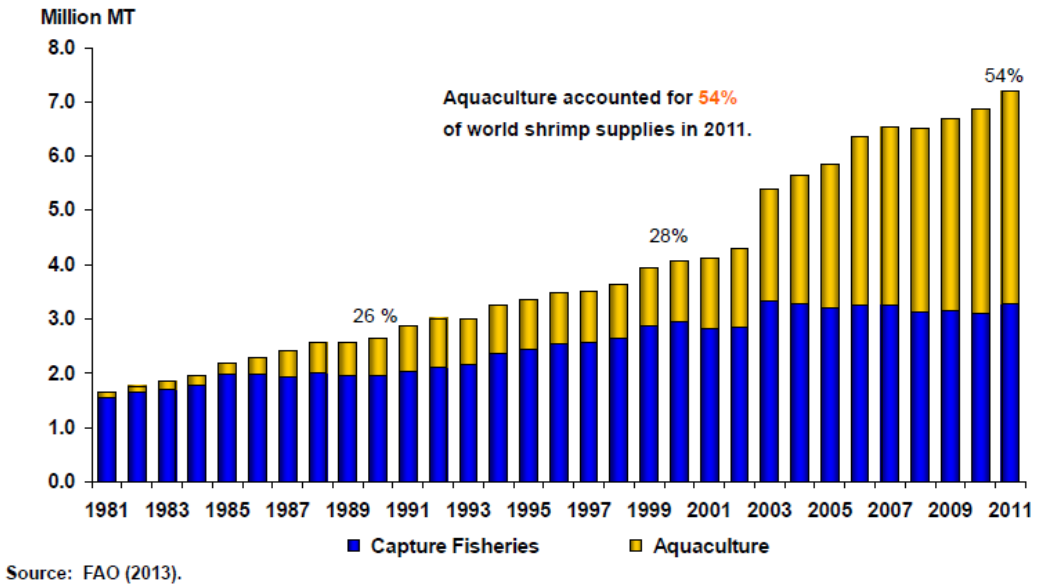
رشد روزافزون جمعیت و نیاز به تامین پروتئین مورد نیاز جوامع بشری زمینه توسعه سیستم های مختلف پرورش دام، طیور و آبزیان را فراهم نموده است. تکثیر و پرورش آبزیان و به ویژه میگو در ۳ دهه اخیر در اکثر کشورهای در حال توسعه شتاب فزاینده ای یافته است. هر چند پرورش میگو از قرنها پیش در مقیاسهای کوچک در سواحل کشورهای شرق آسیا جایی که پرورش دهندگان، میگوها را به صورت اتفاقی و بر اساس جزر و مد در استخرهای کوچک و خوریات جمع آوری می کردند شروع شده بود، ولی اولین تخم گیری موفق و سپس پرورش تخمها به صورت مصنوعی در مقیاس تجاری در سال ۱۹۳۰ و از میگوی ماده کروما[1] با تخمدان رسیده به دست آمد (Hudinaga، ۱۹۴۲). این تکنیک در سالهای بعد در دیگر کشورها و برای سایر گونه ها نیز با موفقیت اجرا و استفاده شد.

صنعت پرورش میگو در شکل و مقیاس کنونی و با مزارع پرورش توسعه یافته که ارزش اقتصادی دارند چند دهه اخیر شروع شده است. از سال ۱۹۷۰ تولید در مزارع پرورش میگو شکل تجاری و اقتصادی به خود گرفت و از اوایل دهه ۱۹۹۰ این پرورش تجاری میگو معنی دار شد و به سوددهی رسید، به طوریکه تجارت جهانی میگو در سال ۲۰۰۱ به حدود ۸ میلیارد دلار رسید (FAO، ۲۰۰۳). هم اکنون بیش از ۶۰ کشور جهان به پرورش میگو مبادرت دارند که باعث ایجاد شغل برای میلیونها نفری شده که اغلب جزء مردم فقیر جهان هستند. در ایران نیز پرورش میگو از اوایل دهه ۷۰ شمسی در استان بوشهر آغاز شد و هم اکنون در چهار استان جنوبی کشور و استان گلستان در حال انجام بوده و در مناطق تحت پوشش باعث توسعه اجتماعی اقتصادی شده است. اگرچه داستان پرورش میگو موفقیت آمیز بوده و این موفقیت همچنان ادامه دارد به طوریکه امروزه بیش از ٪۵۰ تولید کل میگوی جهان از مزارع پرورشی به دست می آید (نمودار ۱-۱) ولی پرورش دهندگان میگو در دهه های اخیر متحمل زیانهای اقتصادی هنگفتی به دلیل بروز بیماریها شده اند (Lightner، ۲۰۰۳).

بیشترین خسارت ناشی از بیماریها ویروسها بوده اند، ولی بیماریهای باکتریایی نیز گروهی از بیماریهای میگوها هستند که پس از ویروسها در شرایط خاصی قادرند باعث تلفات سنگین در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو شوند. با توسعه صنعت پرورش میگو و جایگزینی سیستمهای متراکم به جای سیستمهای گسترده و سنتی سابق، یک محیط مستعد و مناسب جهت رشد و افزایش باکتریها در مزارع پرورش میگو ایجاد شده است (Skjermo و Vadstein، ۱۹۹۹). تجمع باقیمانده های غذا، مدفوع و متابولیتهای آنها در کف استخر یا تانک، محیط غنی و مناسبی جهت رشد و افزایش باکتریها ایجاد می کند، لذا خطر بروز بیماریهای باکتریایی در پرورش متراکم میگو و به خصوص در مراحل لاروی که تراکم بالاست افزایش می یابد (Aguirre و Ascenico ۲۰۰۰). از بین عوامل باکتریایی، بیشتر گونه های مختلف ویبریو عامل این خسارات ذکر شده اند (Lavilla-Pitogo، ۱۹۹۵). در دهه های ۸۰ و ۹۰ میلادی مطالعات زیادی در خصوص ویبریوزیس انجام شده و به عنوان مهمترین عامل عفونی باکتریایی

[1] - *Marsopenaeus japonicus*

در میگوها گزارش می شد (Abraham و Palaniappan، ۲۰۰۴؛ Ruangpan و همکاران، ۱۹۹۵) که می تواند خسارات اقتصادی زیادی از طرق تلفات، کاهش رشد، ایجاد ضایعات بافتی و بد شکلی در ظاهر میگو به صنعت پرورش میگو وارد کند که اثر و شدت این خسارات بسته به نوع و گونه ویبریو و همچنین شرایط آب، غذا، کیفیت و مدیریت پرورش مزرعه میگو متفاوت است (Lightner، ۲۰۰۳).

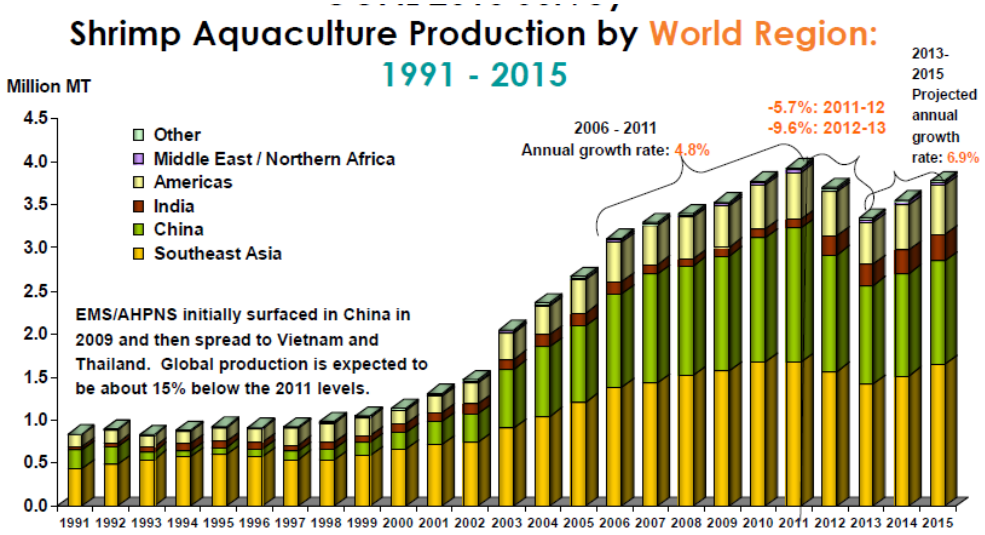


نمودار ۱- ۱: تولید کل میگوی جهان و مقایسه میزان تولید میگوی پرورشی در مزارع میگو با میگوی استیصالی از دریا

از سال ۲۰۰۹ و پس از آنکه حدود دو دهه فکر می شد مشکل اصلی بیماریهای میگو، بیماریهای ویروسی می باشند یک بیماری به نام مرگ زودرس میگو (EMS[۲]) در چند کشور مهم تولید کننده شامل چین (سال ۲۰۰۹)، ویتنام (سال ۲۰۱۰)، مالزی (سال ۲۰۱۱) و تایلند (سال ۲۰۱۲) پدیدار شد (ناکا، ۲۰۱۱؛ Flegel، ۲۰۱۲) که باعث کاهش جهانی تولید میگو حدود ۲۵٪ در سال ۲۰۱۳ در جهان شد (نمودار ۱-۲)، بعدها معلوم شد عامل این بیماری یک باکتری به نام *ویبریو پاراهمولیتیکوس* است (Tran و همکاران ۲۰۱۳).

علاوه بر این در مراکز تکثیر میگو به دلیل تراکم بالا یکی از عوامل محدود کننده رشد و پرورش مراحل لاروی بیماریهای باکتریایی می باشند و تاکنون چندین گونه باکتری که اکثرا از جنس ویبریوها می باشند عامل این محدودیت ذکر شده اند (Nash و همکاران، ۱۹۹۲). در جهت پیشگیری از تلفات پست لاروها و تحریک رشد در مراکز تکثیر هم اکنون به مقدار زیادی از مواد شیمیایی ضدعفونی کننده و آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف استفاده می شود که باعث افزایش مقاومت میکروبی و آلودگی محیط زیست می شود (Sung و Song، ۱۹۹۶).

۲- Early Mortality Syndrome



نمودار ۱- ۲: میزان تولید میگو تا سال ۲۰۱۱ و کاهش تولید به خاطر بروز بیماری EMS طی سالهای ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ و تخمین روند تولید در سالهای آینده

ادامه استفاده از آنتی بیوتیکها نیز باعث ایجاد مقاومت میکروبی و حضور آنتی بیوتیک در بافت میگو می شود، به طوریکه هم اکنون مقاومت میکروبی در مراکز تکثیر و مزارع پرورش آبزیان یک مشکل جهانی است که مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است (Tsoumas و همکاران، ۱۹۸۹; Song و Sung ، ۱۹۹۳؛Mahasneh و همکاران، ۱۹۹۵؛Herwing و همکاران، ۱۹۹۷؛Rahim و همکاران، ۱۹۹۸) همچنین گزارش شده که سویه های درخشان از *ویبریو هاروی* و *ویبریو اسپلندیدوس* جدا شده از لاروهای میگو به برخی آنتی بیوتیکها مثل کانامایسین، پنی سیلین، استرپتومایسین و اریترومایسین مقاوم هستند (Baticados و همکاران، ۱۹۹۰). استفاده از اکسی تتراسایکلین باعث افزایش مقاومت باکتریایی در مزارع پرورش میگو شده است (Nash و همکاران، ۱۹۹۲). همچنین افزایش مقاومت میکروبی به کلرامفنیکل از مراکز تکثیر بسیاری از کشورها مثل اکوادور و فیلیپین گزارش شده است (Baticadosو Padihare، ۱۹۹۲). در داخل کشور نیز مطالعه ای روی مقاومت میکروبی دو باکتری جداسازی شده از سه مرکز تکثیر تجاری در استان بوشهر به نامهای *ویبریو هاروی* و *ویبریو آلژینولیتیکوس* انجام شده است، هرچند *V.harveyi* جدا سازی شده نسبت آنتی بیوتیکهای اکسی تتراسایکلین و تری متوپریم حساس بود ولی همه جدایه های این باکتری نسبت به استرپتومایسین مقاومت نشان دادند. از طرفی *V.alginoliticus* جداسازی شده از هر سه مرکز نسبت به استرپتومایسین مقاومت نشان داد و نتایج حساسیت آنها نسبت به اریترومایسین، اکسی تتراسایکلین و تری متوپریم به ترتیب در مرکز A، مقاوم، نیمه حساس، نیمه حساس، در مرکز B مقاوم، حساس، حساس و در مرکز C نیمه حساس، حساس و حساس بود (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۲).

در زمان استفاده از آنتی بیوتیکها در مزارع پرورشی تخمین زده می شود که به میزان ۱۵ تا ۴۰ درصد داروی استفاده شده حتی به دستگاه گوارش میگو نخواهد رسید و وارد محیط پرورش خواهد شد و قسمت دیگری نیز جذب نشده و توسط مدفوع به محیط بر می گردد، مقدار آنتی بیوتیکی که از این طریق به محیط بر می گردد از یک درصد (کلرامفنیکل) تا ۹۰٪ در مورد اکسی تتراسایکلین متفاوت است (Capone و همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعه دیگری گزارش شده است که ۹۰-۷۰٪ آنتی بیوتیکهای استفاده شده در موجودات پرورشی به محیط بر می گردند که این میزان باعث فعالیت ضدباکتریایی در محیط آبی و رسوبات می شود (Hektoen و همکاران، ۱۹۹۵) و معمولا مدت باقی ماندن این آنتی بیوتیکها بسیار طولانی است برای مثال نیمه عمر اسید اکسولینیک و اکسی تتراسایکلین حدود ۱۰۰ روز می باشد (Samuelsen، ۱۹۹۲). مطالعات دیگری نیز نشان داده اند که آنتی بیوتیک ها به مدت طولانی و گاهی تا چندین ماه پس از استفاده در رسوبات و ستون آب باقی مانده اند (Matyar و همکاران، ۲۰۰۸) که این امر می تواند باعث مهار چرخه مهم میکروبی مثل باکتریهای دنیتریفیکاسیون کننده و یا مهار تولیدات اولیه استخر توسط سیانوباکترها بشود (Garcia-Armisen و همکاران، ۲۰۱۱) یا اینکه ظرفیت میکروارگانیسم ها برای کاهش سولفاتها ممکن است کاهش پیدا کند (Paez-osuna و همکاران، ۲۰۰۳) که این امر نیز می تواند روی کیفیت آب و رسوبات در استخر پرورشی اثر منفی داشته باشد (Ma و همکاران، ۲۰۰۶)؛ بنابراین باقیمانده های آنتی بیوتیکی و افزایش پاتوژنها و باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک ممکن است تولید میگوی پرورشی را نیز به خطر بیندازند (Hektoen و همکاران، ۱۹۹۵؛Capone و همکاران، ۱۹۹۶) هر چند که نگرانی وجود باقیمانده دارویی در غذاهای دریایی برای سلامت انسان مقوله ای، مهمتر است (Stolker و Brikman، ۲۰۰۵).

از طرفی دیگر، یکی از فاکتورهای تعیین کننده در موفقیت پرورش میگو ذخیره سازی لارو با کیفیت بالا می باشد. برای کاهش مشکلات بروز بیماری و رسیدن به تولید بالا و پایدار نیاز است که پست لاروهای با کیفیت بالا ذخیره سازی شود. پست لاروهای با کیفیت بالا نه تنها باعث کاهش تلفات حین پرورش می شوند بلکه موجب رشد بهتر طی دوره پرورش می باشند و دو عامل بقا و رشد فاکتورهای مهمی هستند که مستقیما روی تولید نهایی استخر اثر دارند. لذا استفاده از ترکیب غذایی که هم بتواند احتیاجات تغذیه ای پست لاروها را فراهم کند و هم باعث کاهش عفونتها و آلودگیهای باکتریایی بشود و موجب ایجاد باقیمانده دارویی و مشکلات زیست محیطی و بهداشتی هم نشود برای بهبود کیفیت پست لارو و در نهایت تولید پایدار میگو بسیار مهم است. برای این مهم طی یک دهه اخیر با توجه به گرایش جهانی به طب سبز و پیرو آن آبزی پروری سبز محققین زیادی به بررسی خواص آنتی بیوتیکی گیاهان دارویی و استفاده از آنها در صنعت آبزیان پرداختند (Shangliang، ۱۹۹۰؛ Citarasu و همکاران، ۲۰۰۲)؛ و طی یک دهه اخیر با توجه به کشف مواد فعال زیستی و دارویی فراوان در جلبکهای دریایی نگاه بسیاری از محققین به این موجودات با ارزش معطوف شده است (Chiheb و همکاران، ۲۰۰۹؛ Chew و همکاران، ۲۰۰۸؛ Bansemir و همکاران، ۲۰۰۵).

ب-اهداف تحقیق

هدف کلی از اجرای این تحقیق بررسی و شناخت برخی خصوصیات مهم و کاربردی تعدادی از جلبکهای بومی خلیج فارس و همچنین بررسی سودمندی و امکان استفاده از آنها در صنعت تکثیر و پرورش میگو به منظور همه مشکلات ذکر شده در مقدمه به خصوص حفاظت از محیط زیست و پیشگیری از مقاومت میکروبی ایجاد شده و بهبود کیفیت پست لاروهای میگو و در نهایت امکان توسعه پایدار صنعت میگو توسط برخی مواد خام و اولیه بومی، قابل دسترس و دوست دار طبیعت می باشد. اهداف جزیی این تحقیق نیز موارد ذیل می باشد:

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل استان بوشهر در شرایط آزمایشگاهی

تعیین اثرات ضد باکتریایی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل استان بوشهر در شرایط آزمایشگاهی

تعیین اثر جلبکهای انتخاب شده بر رشد و بازماندگی بچه میگوهای سفید غربی[۳]

تعیین اثر جلبکهای دریایی انتخاب شده در کاهش بار آلودگی باکتریایی در بچه میگوهای سفید غربی

تعیین اثر جلبکهای انتخاب شده در توانایی کاهش بروز بیماری ویبریوزیس در میگوی سفید غربی

[3] *Litopenaeus vannamei*

۲- کلیات

۲-۱- نگاه کلی بر جلبکهای دریایی

۲-۱-۱- انواع جلبکهای دریایی

در دریا سه نوع گیاه شامل فیتوپلانکتونها[۴] یا جلبکهای ریز[۵]، جلبکهای دریایی[۶] یا جلبکهای بزرگ[۷] و علفهای دریایی[۸] وجود دارند. فیتوپلانکتونها، میکروسکوپی بوده و به شکل آزاد و شناور در دریا وجود دارند و جزء اولین تولید کننده های دریا محسوب می شوند. جلبکهای دریایی، ماکروسکوپی بوده که به صورت چسبنده به جایی و یا گاهی آزاد و شناور وجود دارند (Mateljan، ۲۰۰۶). این جلبکها از گیاهان اولیه هستند که فاقد ریشه، ساقه و برگ حقیقی بوده و متعلق به خانواده Thallophyta در سلسله گیاهان می باشند. جلبکهای دریایی به ۳ گروه به نامهای جلبکهای سبز[۹]، جلبکهای قرمز[۱۰] و جلبکهای قهوه ای[۱۱] تقسیم می شوند که این تقسیم بندی بر اساس نوع رنگدانه، شکل شناسی، آناتومی و ساختمان تولید مثلی آنها انجام شده است (ریاحی، ۱۳۷۷).

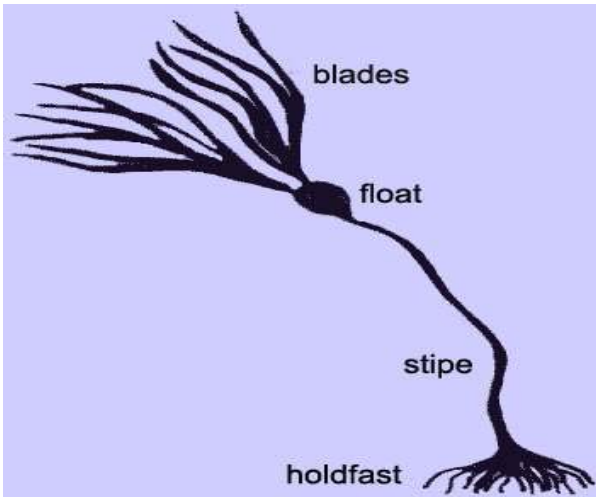
جلبکهای سبز، واقعا سبز هستند چون فاقد رنگدانه هایی هستند که رنگ سبز رنگدانه کلروفیل را بپوشاند، از نظر شکل این جلبکها بسیار متنوع می باشند، از تک سلولی، خیلی کوچک و میکروسکوپی با شنای آزاد تا بوته های چند لایه ای و تا درختان لوله ای بزرگ مشاهده می شوند. جلبکهای قرمز علاوه بر رنگدانه کلروفیل دارای رنگدانه فوکوسیانین و فوکواریترین نیز می باشند که نمای قرمز رنگ به جلبک می دهد و در اشکال متنوع از ساده تا منشعب و رشته ای وجود دارند (کیان مهر، ۱۳۸۴). جلبکهای قهو های پرسلولی بوده و تقریبا در همه اکوسیستمها یافت شده اشکال پهن تا رشته ای دارند، مثل همه فتوسنتز کننده ها دارای رنگدانه سبز کلروفیل می باشند، این گروه از جلبکها همچنین دارای رنگدانه های قهوه ای و طلایی نیز می باشند که رنگ سبز کلروفیل را می پوشانند. رنگدانه غالب در این گروه فوکوگزانتین نام دارد (ریاحی، ۱۳۷۷).

۲-۱-۲- شکل شناسی جلبک های دریایی

جلبکهای دریایی نیازی به ساختارهای حمایتی ندارند. همانطور که در شکل ۲-۱ نشان داده شده است، به جای ریشه، اندامی به نام نگاهدارنده[۱۲] دارند که آنها را به کف دریا یا صخره ها می چسباند. یک نگاهدارنده نیازی به گرفتن آب و سایر مواد مغذی ندارد، بلکه نیاز به یک قلاب دارد که بتواند بچسبد. ساقه در جلبکهای دریایی پایک[۱۳] نامیده می شود. پایک یک ساختار حمایتی دارد که در بین جلبکها بسیار متفاوت است، از نوع قابل

3-Phytoplanktons
4-Micro algae
5-Seaweeds
6-Macro algae
7-Seagrasses
8- Chlorophyta
9-Rhodophyta
10-Pheophyta
[12] Holdfast
[13] Stipe

انعطاف تا سفت و غیر قابل انعطاف، توپر و محکم تا توخالی و پرشده از گاز، خیلی بلند (گاهی تا ۲۰ متر) تا خیلی کوتاه و حتی ممکن است کلا وجود نداشته باشد (Davis، ۲۰۰۲). برگهای جلبکهای دریایی واقعی نیستند بلکه دارای ساختارهای شبه برگی است که Blades نامیده می شوند که عمل اصلی آنها افزایش سطح جذب نور خورشید است. در برخی گونه ها ساختار تولید مثلی نیز روی برگها قرار دارند. تعداد ساختارهای شبه برگی در برخی از جلبکها ممکن است تنها یک عدد باشد و یا اینکه به صورت منشعب و متعدد باشند.



شکل ۲- ۱: نمای کلی و اندامک های یک جلبک دریایی

بسیاری از جلبکهای دریایی واجد ساختارهای خالی[14] و پرشده از گازی هستند که نماتوسیت[15] نیز نامیده می شوند و روی ساختار برگ مانند یا ساقه مانند قرار دارند و موجب شناورسازی جلبک، در معرض نور قرار گرفتن و کمک به جذب بیشتر انرژی خورشید توسط ساختارهای فتوسنتز کننده می شوند (Turner، ۲۰۰۳).

۳-۱-۲- توزیع پراکندگی جلبک ها

فاکتورهای زیست محیطی با اهمیت ترین نقش در توزیع جلبک های دریایی را ایفا می کند. قبل از هر چیز باید مقداری خاک به منظور چسبندگی موجود باشد. این گیاهان در سواحل و مناطق کم عمق دریاها و اقیانوسی ها زندگی می کنند و سه نوع جامعه مجزا را می سازند که هر یک دارای خصوصیات و کاربردهای ویژه خود می باشند. این اجتماعات شامل صخره های مرجانی، مجامع سنگ، مجامع فیتوپلانکتونی می باشند.

در آب های خلیج فارس شرایط بسیار مناسبی برای پرورش جلبک ها وجود ندارد. بررسی های انجام شده بر روی جلبک های خلیج فارس نشان میدهد که رشد جلبک در خلیج فارس ضعیف است و از سواحل به سوی داخل خلیج این رشد کمتر میشود و در دهانه خلیج فارس تعداد جلبک بیشتر است. علت فقر جلبک در خلیج

[14] Float
[15] Pneumatocyte

فارس را باید در کمی عمق و دمای بالای آب جستجو کرد. در نزدیکی بوشهر، جلبک ها رشد خوبی دارند و دلیل آن اختلاف جزر و مد بالای ۱/۵ متر در این منطقه است. بستر خلیج فارس به علت ماسه ای و گلی بودن نیز برای رشد جلبک ها نامناسب است (سهرابی پور و سرطاوی، ۱۳۸۰). در مطالعات اکولوژیک گیاهان دریایی سواحل خلیج فارس (جزایر قشم، هرمز و لارک) رویش نمونه های غالب جلبک های دریایی در نواحی جزر و مدی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله نشان دهنده ی آن است که شرایط فصلی و تغییرات آب و هوایی بر تنوع و فروانی گونه های جلبکی تاثیر گذار است به طوریکه، در اسفند ماه انواع جلبک های سبز غالب میشوند، در بهار تراکم جلبک های قرمز نسبت به قهوه ای بیشتر است و در تابستان فراوانی با جلبکهای قهوه ای است. ولی تنوع جلبکها در فصول سرد سال (اواخر پاییز و زمستان) از بقیه فصول سال به طور قابل ملاحظه ای بیشتر است (قرنجیک، ۱۳۸۲).

۴-۱-۲-تنوع زیستی جلبکهای دریایی در سواحل خلیج فارس و دریای عمان

به طور کلی در ایران بر روی جلبکها مطالعات کمی صورت گرفته است، اما از مواردی که مطالعه شده بیشترین مورد در خصوص شناسایی و تنوع زیستی جلبکها در سواحل بوده است. برای اولین بار دایسینگ[۱۶] و اندلیچر[۱۷] (۱۸۴۵) شش گونه جلبک را در سواحل جزیره خارک شناسایی نمودند که از این تعداد جهار گونه جلبک قهوه ای و دو گونه جلبک قرمز بود (قرنجیک و همکاران، ۱۳۹۰). پس از آن یک دانشمند جلبک شناس دانمارکی[۱۸] (بورگسن)، در سواحل بوشهر، جزایر خارگ و کیش اقدام به نمونه گیری از جلبکها کرد که حاصل آن شناسایی ۱۰۳ گونه جلبک بود، از این تعداد ۲۲ گونه جلبک سبز، ۲۶ گونه جلبک قهوه ای، ۴۶ گونه جلبک قرمز و ۹ گونه جلبک سبز – آبی تشخیص داده شد (Borgesen، ۱۹۳۹). نیوتن نیز در سال ۱۹۵۵ طی دو فهرست، جلبکهای سواحل بحرین و کویت را ارائه نمود. این فهرستها شامل ۱۳ گونه جلبک سبز، ۲۶ گونه جلبک قهوه ای، ۳۰ گونه جلبک قرمز و ۱۲ گونه جلبک سبز- آبی بود (نبی پور و مراد حاصلی، ۱۳۸۰). شوقی نیز، ۴۶ نمونه از سواحل استان و بلوچستان جداسازی و شناسایی کرد (قرنجیک و همکاران،۱۳۹۰). در یکی دیگر از مطالعات جامع در خصوص شناسایی جلبکهای سواحل خلیج فارس، ۱۵۳ گونه جلبک شناسایی شد که از این تعداد ۱۴۲ متعلق به جلبکهای سبز، قرمز و قهوه ای بود و بقیه جزء گزانتوفیتا و سیانوفیتا تشخیص داده شدند (سهرابی پور و همکاران، ۱۳۸۲). قرنجیک (۱۳۷۹) نیز اقدام به شناسایی جلبکهای سواحل استان سیستان و بلوچستان کرد که موفق شد تعداد ۸۵ گونه را از همدیگر متمایز کند.

[16] Diesing
[17] Endlicher
[18] Borgesen

۵-۱-۲- موارد استفاده جلبکهای دریایی

- جلبکهای دریایی به عنوان غذای انسان

از بدو پیدایش بشر تاکنون مردم برخی سواحل به خصوص در شرق آسیا این جلبکها را برداشت به عنوان غذا مصرف می کرده اند (Yoang و همکاران، ۲۰۰۶). چینی ها، ژاپنی ها، فیلیپینی ها و مردم سواحل هاوایی احتمالا جزء اولین مردمی بودند که جلبکهای دریایی را در جیره غذایی خود گنجاندند، سپس این غذاها به یک بخش مهم از جیره غذایی مردم ایسلند، اسکاتلند، سواحل اقیانوس آرام و سواحل ایالات متحده نیز تبدیل شد (Webb، ۱۹۹۷). هم اکنون در سواحل کالیفرنیا به میزان زیادی جلبک دریایی به نام کلپ[19] توسط ماشینهای بزرگ برداشت می شوند. جلبکهای دریایی در اکثر فرهنگهای کشورهای شرق آسیا به قسمت عمده ای از رژیم غذایی تبدیل شده است، ۲۵ درصد غذاهای ژاپنیها حاوی جلبکهای دریایی است و چینی ها در سوپهایشان از این جلبکها استفاده می کنند (Smith، ۱۹۹۲). در بخشهای مختلف جهان بیش از یکصد نوع جلبک که عمدتاً از جلبکهای قهوه ای و قرمز هستند به عنوان غذا استفاده می شوند. تعداد اندکی از جلبکهای سبز نیز که مواد معدنی، ویتامین، قند و پروتئین بالایی دارند، به این منظور مورد استفاده قرار می گیرند، از جلبکهای قهوه ای جنسهای *لامیناریا*، *سارگاسوم* و *آلاریا* معروفند. در آمریکای جنوبی، نوعی جلبک قهوه ای را جمع آوری کرده و پس از خشک کردن و نمک زدن، به تدریج به مصرف تغذیه می رسانند. از جلبکهای قرمز جنسهای پورفیرا و کوندروس معروفند، پورفیرا از مهمترین جلبکهای قرمز است که توسط انسان به عنوان غذا مورد استفاده قرار می گیرد (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۳). چندین مطالعه روی ارزش غذایی جلبکهای دریایی در نواحی مختلف جهان انجام شده است (Chan و همکاران، ۱۹۹۷؛ Akhtar و Sultan، ۲۰۰۲). در ایران نیز طی یک تحقیق روی ۸ گونه جلبک دریایی جداسازی شده از سواحل خلیج فارس، شامل جلبکهای سبز (یک گونه)، قهوه ای (یک گونه) و قرمز (۶ گونه) ارزش غذایی آنها مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه مشخص شد که جلبک قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا*[20] حاوی بیشترین مقدار (۴۱/۷۲٪) و جلبک قهوه ای *کُلپومنیا سینوزا*[21] دارای کمترین مقدار (۱۱/۳٪) کربوهیدرات بود. پروتیین کل در یک دامنه از ۱۵/۸٪ تا ۷/۴۹٪ قرار داشت که بیشترین و کمترین آن به ترتیب مربوط به جلبکهای قرمز *Champia parvula* و *Acanthophora spicefera* متعلق بود، میزان پروتئین در جلبک سبز *کالرپا سرتولاریودس*[22] برابر ۱۲/۳٪ بود. مقدار چربی خام به طور کلی در جلبکهای دریایی پایین است در این مطالعه مقدار چربی خام در جلبک سبز *کالرپا سرتولاریودس* و جلبک قهوه ای *کُلپومنیا سینوزا* به ترتیب ۲/۸۹٪ و ۲/۹۴٪ گزارش شده است، در حالیکه بیشترین و کمترین مقدار چربی خام به ترتیب در جلبکهای قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا* (۵/۶٪) و *جانیا رابنز*[23] (۱/۸۸٪) ثبت شده است (Mohammadi و

---

[19] Kelp
[20] *Gracillaria corticata*
[21] *Colpomenia sinuosa*
[22] *Caulerpa certulariodes*
[23] *Jania rabens*

همکاران، ۲۰۱۳). هرچند در ایران تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده غذایی از جلبکهای دریایی مشاهده نشده است ولی مصرف آن در کشورهای آمریکایی و اروپایی نیز مثل کشورهای شرق آسیا روز بروز در حال افزایش است و هر روز افراد بیشتری از سودمندی جلبکهای دریایی مطلع می شوند به طوریکه هم اکنون در ۳۱ کشور دنیا به پرورش جلبکهای دریایی در حد تجاری می پردازند. میزان تولید جهانی این جلبکها در سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۱۹ میلیون تن و مقدار ارزش آنها به ۴/۴ میلیارد دلار رسیده است که بیش از ۹۵٪ از این مقدار از طریق پرورش حاصل می شود و حدود ۶۵٪ جلبکهای تولید شده مستقیما به مصرف انسان می رسد (FAO، ۲۰۱۲).

-سایر استفاده های جلبکهای دریایی

امروزه گستره استفاده از جلبکهای دریایی به حدی رسیده است که به جرات می توان گفت جلبکهای دریایی یا متابولیتهای آنها در همه صنایع قابل استفاده می باشند. همانطور که بیان شد، قسمت اعظم این جلبکهای تولید شده در جیره غذایی انسان استفاده می شود علاوه بر آن در برخی کشورها به عنوان غذای دام و طیور استفاده می شود. تقریبا از هر ۵۰ هزار تن جلبک تر برداشت شده، حدود ۱۰ هزار تن آرد جلبک بدست می آید که ارزش دلاری آن بالغ بر ۵ میلیون دلار آمریکا می باشد. در برخی از کشورهای آسیایی مثل ژاپن، چین و برخی از کشورهای اروپایی مثل فرانسه، فنلاند، اسکاتلند، از جلبکهای دریایی به ویژه جلبکهای قهوه ای برای خوراک حیوانات اهلی استفاده می کنند .در اسکاتلند، جلبکهای قهوه ای *سارگاسوم*، *فوکوس* و *لامیناریا* بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند. در فنلاند از *لامیناریا* و *آلاریا* استفاده می شود. از *ماکروسیستیس* نیز برای تغذیه دامهای اهلی استفاده می شود، زیرا سرشار از ویتامین A و E است (کیان مهر، ۱۳۸۴). استفاده از جلبکها به عنوان علوفه تا ۱۰٪ تولید شیر را بدون اینکه هیچ تغییری در مزه و طعم آن ایجاد نماید افزایش داده و باعث افزایش مقدار چربی و کرهٔ شیر می گردد.

استفاده از جلبک ها بعنوان کود در کشاورزی نیز گزارش شده است (کیان مهر، ۱۳۸۴). جلبکها به خاطر دارا بودن مقدار فیبر بالا باعث نرم کردن بافت خاک و حفظ رطوبت آن و از طرفی به خاطر دارا بودن مواد معدنی و عناصر کمیاب موجب غنی سازی خاک می شوند. مطالعات مختلف علمی ثابت کرده است که کارایی این محصولات (فرآورده ها) بطور گسترده ای در صنعت باغبانی مورد استقبال قرار گرفته است، بطوریکه بعد از استفاده از این فرآورده ها، افزایش محصول، افزایش جذب مواد غذایی خاک، افزایش مقاومت به آفات خاص، افزایش جوانه زنی بذر و مقاومت در مقابل یخ زدگی را در پی داشته است. به هر حال از زمان پی بردن به چنین خواص کارآمدی در جلبک ها، به نظر می رسد با توجه به پیشرفت کشاورزی و آبزی پروری ارگانیک، بازار روبه رشد فزاینده ای داشته باشد. در انگلستان از جلبکها بعنوان کود برای محصولاتی چون سیب زمینی، کلم و سبزیجات استفاده می شود. همچنین گزارش شده است که دادن کود جلبکی به مزارع سیب زمینی باعث می شود قدرت مقابله این گیاه در مقابل بیماری قارچی افزایش یافته و نسبت به بیماریهای ویروسی چون پیچ

خوردگی برگ مقاومت پیدا کنند. در مورد گوجه فرنگی دادن کود جلبکی سبب افزایش دوره میوه دهی گوجه فرنگی شده و زمین را از وجود شته ها عاری می سازد (Dawes، ۱۹۸۰).

مهمترین مورد استفاده جلبکها پس از غذای انسان استفاده در صنعت می باشد. بیشترین دلیل استفاده جلبکها در صنعت وجود مقدار قابل توجه ترکیبات پلی ساکاریدی نظیر آگار، آلژینات، کاراگینان و ... در دیواره جلبکها است (Bilan و همکاران، ۲۰۰۷). به طور کلی فیکوکلوئیدها یا کلوئیدهای جلبکی مهمترین محصول تجاری مشتق شده از جلبکها هستند. این مواد از دیواره ی سلولی جلبکها بدست آمده و به جهت اینکه قابلیت تبدیل از حالت مایع (Sol) به جامد (Gel) دارند، مفید می باشند، هیدروکلوئیدها مواد غیر کریستال با مولکولهای بزرگی می باشند که در آب حل شده و حالت محلول چسبنده[۲۴] ایجاد می کنند (Wantanabe و همکاران، ۱۹۹۹).

آلژینات که از جلبکهای قهوه ای به خصوص کلپها (*آسکوفیلوم*، *لامیناریا* و *ماکروسیستیس*) به دست می آید به علت کاهش تولید کریستال هنگام یخ زدن و یکنواخت کردن بافت آن در بستنی سازی، در کرمهای آرایش به عنوان نرم کننده، در شربتها به عنوان امولسیون کننده و همچنین در صنعت شکلات سازی استفاده دارد (Kaladharan و همکاران، ۱۹۹۸).

آگار که از جلبکهای قرمز به خصوص جنسهای *ژیلیدیوم*[۲۵] و *گراسیلاریا* تولید می شود، بیشترین مصرف در مطالعات باکتری شناسی به عنوان محیط کشت دارد ولی در صنایع گوشت، ماهی کنسرو شده و تهیه کلوچه های گوشتی هم مصرف دارد (قرنجیک، ۱۳۸۰).

۲-۲-مروری بر فعالیتهای بیولوژیک عصاره های جلبکی

۱-۲-۲- فعالیتهای ضدباکتریایی جلبکهای دریایی

فعالیت ضدباکتریایی جلبکهای دریایی در اکثر مناطق ساحلی جهان و علیه بسیاری از باکتریهای پاتوژن و غیر پاتوژن بررسی شده است که در ادامه به برخی از این مطالعات اشاره می شود.

از اولین و گسترده ترین کارهای پایش جهت خواص ضدباکتریایی جلبکها، مطالعه ای است که در سواحل انگلستان انجام شده است (Hornesy و Hide، ۱۹۷۴)، عصاره خام ۱۵۱ گونه از جلبکهای دریایی برای اثبات خواص ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفت که از این مطالعه نتایج مهم و امیدوار کننده ای برای مطالعات بعدی گرفته شد. اکثر گونه های جلبکهای قرمز فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهایی نظیر *S.aureus*، *E.coli*، *Bacillus subtilis* و جنس *پروتئوس* داشتند. در این مطالعه مشخص شد ۱۲ جنس از جلبکهای قهوه ای مورد بررسی و تعداد زیادی از جلبکهای سبز نیز اثرات مشابه ضدباکتریایی دارند.

---

[24] Viscous slouble
[25] *Gelidium*

با توجه به نتایج مثبت و تاثیرات مفید جلبکهای دریایی علیه باکتریهای مختلف، این گونه مطالعات در سایر مناطق جهان هم ادامه پیدا کرد، از جمله در هندوستان (Rao و Parekh، ۱۹۸۱) دریافتند که عصاره خام جلبکهای سبز (*کالرپا، انتروموفا و هالیمدا*)، قرمز (*گراسیلاریا*، ژیلیدلا و *لورنسیا*) و قهوه ای (*پادینا*، *دیکتیوتا*) دارای اثرات بیولوژیکی قوی بر میکروارگانیسم ها می باشند.

خواص ضدمیکروبی ۳۵ جلبک دریایی نمونه برداری شده از سواحل سری لانکا نیز بررسی شده است (Bandara و همکاران، ۱۹۸۸). نتایج این بررسی نشان داد که ۲۶ گونه از جلبکهای مورد بررسی دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی بودند.

در مطالعه دیگری روی ۳۰ گونه جلبک جمع آوری شده از سواحل اقیانوس هند در منطقه تامیل نادو[۲۶] نشان داد که عصاره های به دست آمده از گونه های Enteromorpha *compressa*، *Sargassum wightii*، *Padina gymnospora* و *Gracilaria corticata* اثرات قوی ضدباکتریایی علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی داشت (Rao و همکاران، ۱۹۹۱).

اثرات ضدمیکروبی جلبکهای سواحل ترکیه نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Tuney و همکاران، ۲۰۰۶). در این بررسی ۶ عصاره حاصل از حلالهای مختلف از ۱۱ گونه جلبک دریایی علیه باکتریها و قارچ های بیماریزای انسانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد عصاره های مختلف هر جلبک دارای فعالیتهای ضدمیکروبی متفاوتی از بی اثر تا قوی دارند.

اثرات ضدباکتریایی عصاره های خام متانولی به دست آمده از ۳۲ جلبک پرسلولی (۱۳ جلبک سبز و ۱۹ جلبک قهوه ای) جمع آوری شده از سواحل مدیترانه در حاشیه کشور مراکش هم مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نیز نشان داد بسیاری از عصاره ها دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه پاتوژنهای انسانی نظیر *E.coli*، *S.aureus*، *Enterococcus faecalis* می باشند (Chiheb و همکاران، ۲۰۰۹).

۷۱ گونه از جلبکهای دریایی سواحل مرکزی مدیترانه به منظور ارزیابی وجود پتانسیل ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، سمیت برای سلولها (سیتوتوکسیستی)[۲۷] و ضد میتوزی بررسی شدند (Ballesteros و همکاران، ۱۹۹۲). نتایج نشان داد، ۵۶ گونه از جلبکها انواع مختلف فعالیتها را از خود نشان دادند و اکثرا علیه همه پاتوژنها و سلولهای تست شده فعال بودند. در کل فعالیت ضدقارچی در ۷۰ درصد موارد دیده شد ولی فعالیت ضدباکتریایی فقط در شش درصد موارد وجود داشت، ۲۱٪ جلبکها دارای فعالیت ضد ویروسهای مورد آزمون بودند، ۳۵٪ فعالیت سیتوتوکسیتی داشتند و نزدیک به ۵۰٪ جلبکها پتانسیل ضدمیتوزی (ضد سرطانی) داشتند.

پتانسیل ضدمیکروبی شش جلبک سبز از سواحل کشور تانزانیا نیز علیه سه باکتری پاتوژن انسانی، یک مخمر و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مورد ارزیابی قرار گرفت (Mtolera و Semesi، ۱۹۹۶). عصاره جلبک *Valonia aerophila*

[26] Tamil Nadu
[27] Cytotoxicity

بیشترین فعالیت علیه همه پاتوژنهای تست شده داشت و سایر عصاره ها فعالیت بیشتری علیه باکتریها نسبت به پنی سیلین G داشتند.

بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبکهای دریایی جداسازی شده از سواحل کراچی کشور پاکستان نیز حاکی از وجود پتانسیل ضدباکتریایی در این جلبکها داشت (Rizvi، ۲۰۱۰).

خواص و فعالیت ضدمیکروبی جلبکهای جداسازی شده از سواحل خلیج فارس تنها در چند مطالعه کوتاه بررسی شده است، در مطالعه ای مشخص شد عصاره آبی جلبک قهوه ای *Cystoseria myrica* به دست آمده از سواحل استان بوشهر در حاشیه خلیج فارس علیه هرپس ویروس موثر است (Zandi و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین اثرات ضدباکتریایی عصاره های دو جلبک قرمز (*لورنسیا*) و قهوه ای (*سارگاسوم*) بدست آمده از سواحل شهر بوشهر واقع در حاشیه خلیج فارس علیه پاتوژنهای انسانی مورد بررسی قرار گرفته است (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج این مطالعه حاکی از موثر بودن عصاره مذکور بر بازدارندگی رشد باکتریهای مورد آزمون داشت. در مطالعه دیگری نیز اثرات عصاره هیدروالکلی سه جلبک سبز (*E.intesinalis*)، قرمز (*G.corticata*) و قهوه ای (*C.myrica*) جمع آوری شده از سواحل شهر بوشهر بر باکتریهای *لیستریا منوسیتوژن* و *اشریشیا کولی* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آزمون بیان کرد هیچ کدام از عصاره های مذکور اثر بازدارندگی بر باکتریهای مورد آزمایش نداشته اند (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲)؛ اما مطالعه دیگری نشان داد که عصاره های کلروفرمی و اتانولی جلبک *سارگاسوم لاتیفولیوم* نمونه برداری شده از سواحل خلیج فارس دارای اثرات ضدباکتریایی موثری بر باکتریهای جنس ویبریو جداسازی شده از میگوهای پرورشی می باشد (Dashtiannasab و همکاران، ۲۰۱۲).

۲-۲-۲-فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای دریایی

گونه های مختلف اکسیژن واکنشگر (ROS)[۲۸] از قبیل رادیکالهای سوپراکساید ($O_2^{\cdot}$، $OOH^{\cdot}$)، هیدروکسیل (OH-) و پراکسیل (ROOH) طی متابولیسم های بدن مدام در حال تولید می باشند. امروزه نقش عمده این رادیکالها در بروز استرس اکسیداتیو و پیشرفت بیماریهای صعب العلاج به خوبی روشن شده است (جمشیدی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین نقش اکسیژن واکنشگر در پراکسیداسیون چربیها نیز مشخص شده است که از این طریق باعث تخریب غذاها و رشد میکروارگانیسم ها در غذا می شوند (مصحفی و همکاران، ۱۳۸۵). امروزه به منظور حل این دو معضل از آنتی اکسیدانها استفاده می شود.

آنتی اکسیدان به ترکیباتی اطلاق می شود که به طور موثر و از طرق مختلف از واکنش رادیکالهای آزاد اکسیژن، نیتروژن فعال و یا بیومولکولهایی نظیر پروتیین، اسید آمینه، لیپید و DNA جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و مرگ سلولها می شود (عیوقی و همکاران، ۱۳۸۸). آنتی اکسیدانها به دو دسته شیمیایی و طبیعی

[28] Reactive Oxygen Species

تقسیم می شوند که هم اکنون از دسته اول بیشترین استفاده می شود که روشن شده است دارای مضرات فراوانی برای سلولهای زنده است (Kahl و Kappus، ۱۹۹۳)، لذا تلاشها برای استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی معطوف شده است.

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنلی، فلاونوییدها و تانن ها هستند که مهمترین آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار می روند. در چند دهه اخیر دیده شده جلبکهای دریایی که از دیرباز در جوامع مختلف بشری مصرف می شده اند نیز دارای ترکیبات آنتی اکسیدان می باشند، لذا تحقیقات گسترده ای در تمام نقاط جهان برای این منظور انجام شده است که در ادامه اشاره می گردد.

در یک مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی ۲۷ گونه جلبک دریایی نمونه برداری شده از سواحل کشور چین مورد ارزیابی قرار گرفت (Hou، ۲۰۰۰). از میان جلبکهای مورد بررسی ۱۵ گونه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار حداقل در یک حلال آلی بود که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی برای جلبک *Gloiosphonia capliiries* ثبت شده است.

در یک مطالعه دیگر چند گونه جلبک دریایی از لحاظ فعالیت آنتی اکسیدانی بررسی شده اند، نتایج نشان داد جلبکهای سبز و قرمز اثرات بازدارندگی بیشتری در بروز سرطان روده، پوست و پستان جوندگان دارند (Yuan و همکاران،۲۰۰۵).

Kumar و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنتی اکسیدانی سه گونه جلبک به نامهای *G.edulis*، *Euchema kappaphycus* و *Acanthophera spicifera* جمع آوری شده از سواحل هندوستان را بررسی کردند، در گزارش ایشان آمده است که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی جلبکها دارای بیشترین میزان فنل بوده است.

پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره های آنزیمی ۷ گونه از جلبکهای قهوه ای نیز در مقایسه با آنتی اکسیدانهای تجاری ارزیابی شده است (Soon Jin و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه معلوم شد عصاره های آنزیمی جلبکها دارای فعالیت قوی (بیش از ۹۰٪) در برداشت رادیکالهای آزاد پراکسید هیدروژن می باشند و حتی در برخی موارد نتایج از آنتی اکسیدانهای تجاری نیز بهتر بود.

فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای خوراکی سواحل ایرلند نیز بررسی شده است (Cox و همکاران، ۲۰۱۰). در این مطالعه مشخص شد عصاره خشک متانولی در بین سایر عصاره ها به طور معنی داری دارای میزان ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت بیشتری برای برداشت رادیکال آزاد مولکول DPPH می باشد به طوریکه غلظت برداشت ۵۰٪ رادیکال آزاد (EC_{50}) عصاره متانولی ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود.

خواص عصاره های مختلف جلبکهای قهوه ای و قرمز سواحل هندوستان برای حذف رادیکالهای آزاد مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه مشخص شد عصاره متانولی جلبکهای قهوه ای اثرات بهتری در حذف رادیکالهای آزاد دارند (Sachindra و همکاران، ۲۰۱۰).

در سواحل خلیج فارس مطالعات انگشت شماری روی جلبکهای دریایی و همچنین اثرات آنتی اکسیدانی آنها شده است. در یک مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی و اتانولی یک جلبک قهوه ای *S. boveanum* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر مورد بررسی قرار گرفت (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷). این مطالعه نشان داد هر دو عصاره اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجهی نسبت به کنترل دارند، همچنین نتایج تحقیق نشان داد عصاره آبی اثرات آنتی اکسیدانی قوی تری نسبت به عصاره اتانولی دارد. همچنین در یک مطالعه دیگر اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی سه جلبک سبز (*E.intesinalis*)، قرمز (*G.corticata*) و قهوه ای (*C.myrica*) نمونه برداری شده از سواحل شهر بوشهر مورد بررسی قرار گرفته است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج این تحقیق نشان داد بیشترین مقدار فنل تام و بهترین فعالیت ضداکسیدانی با آزمون پتانسیل آنتی اکسیدانی معادل ترولکس متعلق به جلبک سبز و کمترین این مقادیر مربوط به عصاره هیدروالکلی جلبک قرمز بود، البته اختلافها از نظر آماری معنی دار نبوده اند. در یک بررسی نیز از عصاره آبی جلبک قهوه ای *S.angustifolium* جداسازی شده از سواحل استان بوشهر به عنوان آنتی اکسیدان در نگهداری گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی در یخچال انجام شده است (باباخانی لشکان و همکاران، ۱۳۹۲) که پس از استفاده آنالیز میزان پراکسید، اسیدهای چرب آزاد، تیوباربیتوریک اسید و ترکیب اسیدهای چرب نمونه ها نشان داد که نمونه های حاوی عصاره جلبکی با غلظت ۳۰۰ پی پی ام قادر است فساد اکسیداسیونی کمتری نسبت به سایر تیمارها ایجاد کند.

۳-۲-کاربرد جلبکهای دریایی در آبزی پروری

جلبکهای دریایی یکی از محصولات مهم تجاری در جهان هستند که قرنها است به دلیل داشتن کاروتنوئیدها، فیبرهای غذایی، پروتیین ها، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها و مواد معدنی در جیره غذایی مردم شرق آسیا استفاده شده است (Norzian و Ching، ۲۰۰۰). بر همین اساس و با توجه به کشف مواد بیولوژیک فعال جدیدتری در این جلبکها، اخیرا علاوه بر تغذیه به منظورهای متنوع دیگری نیز، این موجودات گرانبها به روشهای مختلفی در آبزی پروری مورد استفاده قرار گرفته اند که به برخی از آنها اشاره می شود. البته در این جا سعی می شود روی میگو فوکوس شود اما گه گاهی رفرانس هایی در خصوص سایر گونه های آبزی هم ذکر شده است.

از برخی جلبکهای پرسلولی مثل *Macrocystis pyirifera* (معروف به کلپ)، *Ascophyllum nodosum*، *Kappaphycus alvarezii*، *Sargassum spp.Gracilaria heteroclada* در غذای میگو استفاده شده است و عملکرد آنها در جیره مورد ارزیابی واقع شده است (Penaflorida و Golez، ۱۹۹۶)؛

در مطالعه ای (Da Silva و Barbosa، ۲۰۰۹) از پودر جلبک دو گونه جلبک دریایی در برزیل به عنوان منبع پروتیین در غذای میگوی میگوی وانامی استفاده کرده اند. قبل از آن هم از پودر جلبک *Laminaria digitata* به عنوان بخشی از جیره غذایی میگوی وانامی استفاده شده بود (He و Lawrence، ۱۹۹۳).

چندین جلبک دریایی پرسلولی همچنین در جیره غذایی برخی از ماهیان پرورشی مورد استفاده قرار گرفته و اثرات مختلف آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Nakagava و Montgomery، ۲۰۰۷).

در چندین تحقیق گزارش شده که پودر جلبکها می تواند به عنوان همبند در جیره غذایی آبزیان عمل کند (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶؛ Cruz-suarez و همکاران، ۲۰۰۸). اکثر نتایج نشان داده اند که استفاده از جلبکهای دریایی در فرمول جیره آبزیان باعث بهبود کیفیت پلت شامل نگهداری آب، بهبود ظرفیت نگهداری آب و همچنین بهبود کیفیت پلت می گردد و از این طریق باعث بهبود تاثیر جیره می گردند برای مثال در مطالعه ای جایگزینی آرد سویا و آرد گندم توسط درصدهای مختلف (۰-۳۰٪) توسط پودر جلبک قرمز گراسیلاریا بررسی شده، نتایج نشان داده که فاکتور ماندگاری در آب غذای تیمار حاوی تا ۱۰٪ پودر جلبک تفاوت معنی داری با گروه کنترل (غذای تجاری) طی ۱۲ ساعت نداشته است و جیره های بیش از ۱۵٪ به میزان ۸۸٪ آب در خود نگهداری کرده بود (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶). مطالعات دیگری نیز در این خصوص انجام شده است که اکثرا نتایج مناسبی داشته اند (Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷). خواص بایندری (همبندی) جلبکها و همچنین ظرفیت بالای آنها در جذب آب را به خواص ژلاتینه شدن آنها و میزان آلژینات موجود در آنها ربط می دهند (Kuda و همکاران، ۱۹۹۷).

از جلبک قهوه ای *Cladosiphan okamuranus* یک پلی ساکارید سولفاته به نام فوکوئیدان استخراج شده (Itami و همکاران، ۲۰۰۲) که از آن در غذای میگوی ژاپنی به منظور بهبود سیستم ایمنی میگو در برابر WSSV استفاده شده است.

بر اساس یک گزارش دیگر استفاده خوراکی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه ای *Sargassum polycystum* در غذای میگو های ۸-۵ گرمی و ۱۵-۱۲ گرمی می تواند سبب کاهش اثر WSSV بر میگوی ببری سیاه[29] گردد (Chotigeat و همکاران، ۲۰۰۴). آنها همچنین مشاهده کردند که فوکوئیدان بر باکتری های *ویبریو هاروی*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *اشریشیا کلی* نیز اثر بازدارندگی دارد.

در مطالعه ای از آلژینات سدیم جداسازی شده از جلبکهای دریایی به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم به منظور تحریک سیستم ایمنی میگوی وانامی در برابر عفونت حاصله بر اثر *Vibrio alginolyticus* استفاده شده است (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵).

از عصاره اتانولی *Sargassum fusiforme* اضافه شده به غذای میگوی چینی[30] نیز به منظور تحریک سیستم ایمنی و مقاومت میگوها در برابر بیماری ویبریوزیس استفاده شده است (Huang و همکاران، ۲۰۰۶).

---

[29] *Penaeus monodon*

[30] *F. chinensis*

در یک مطالعه در مکزیک دیده شده استفاده از عصاره آبی جلبک *M. Pyrifera* به صورت تزریقی روی افزایش تعداد هموسیتهای میگوی وانامی و تحریک سیستم ایمنی در برابر آلودگی باکتریایی *V.campbellii* موثر واقع شده است (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۴).

اخیراً چندین مطالعه در خصوص کشت توام جلبکهای دریایی با سایر آبزیان به منظورهای مختلف شامل تغذیه، بهبود کیفیت آب، پیشگیری و کنترل بیماریها و غیره انجام شده است (Porchas-Corenjo و همکاران، ۱۹۹۹؛Neori و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lombardi و همکاران، ۲۰۰۶).

۴-۲-غنی سازی آرتمیا

استفاده از آرتمیا از سال ۱۹۳۰ زمانی که محققان آن را یک غذای عالی جهت تغذیه لاروهای تازه تفریخ شده معرفی نمودند آغاز گردید. امروزه استفاده از اشکال متنوع آرتمیا از جمله تخم مقاوم (سیست)، تخم پوسته زدایی شده، نوزاد (ناپلیوس)، آرتمیای بالغ، آرتمیای منجمد و خشک شده در پرورش لارو میگو و ماهیان پرورشی رایج است. آرتمیا از بی مهرگان نادری است که در برابر شوریهای مختلف تطابق بالایی دارد و به طور وسیع در جهان انتشار دارد (Larger و همکاران، ۱۹۸۶). آرتمیا از نظر تغذیه یک پالایشگر غیر انتخابی است، تخم آرتمیا پس از شکوفایی، وقتی با پوست اندازی به دومین مرحله ناپلی (اینستار ۲) می رسد (یعنی حدود ۸ ساعت بعد تخم گشایی) شروع به فیلتر کردن ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرومتر صرف نظر از ماهیت آنها می کند. از طرفی ناپلی آرتمیا به عنوان بهترین غذای زنده قابل دسترس به طور وسیعی در پرورش لارو ماهیان دریایی و سخت پوستان در تمام نقاط جهان مورد استفاده قرار می گیرد (Lavens و Sorgelous، ۱۹۸۶). با توجه به این دو موضوع امروزه از آرتمیا تحت فرایند غنی سازی برای رساندن مواد مختلفی از قبیل مواد مغذی شامل ویتامینها، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب بلند زنجیره غیره اشباع و غیره یا سایر موارد مثل داروها، واکسن ها، پروبیوتیک ها، هورمون ها، رنگدانه ها استفاده می کنند (Lepeage و Roy، ۱۹۸۴). این عمل به منظور انتقال این ترکیبات به جانور شکارچی و بهبود کیفیت لارو، افزایش بازماندگی و مقاومت آن در برابر تنش های محیطی و بیماریهای مختلف انجام می شود (Lepeage و Roy، ۱۹۸۴؛ Bell و همکاران، ۲۰۰۱). در این قسمت به چندین مطالعه جدید شبیه به مطالعه ما اشاره می گردد.

در یک مطالعه، ناپلی آرتمیا توسط دو محصول از گیاهان دارویی به نامهای Stressol یک و دو غنی سازی شده و به میگوی سفید هندی[31] خورانده شد و تاثیر آن روی رشد میگوها و مقاومت در برابر استرس شوری بررسی شده است (Chitra، ۱۹۹۵).

چندین مطالعه روی آرتمیای غنی سازی شده با گیاهان دارویی و خوراندن آنها در مرحله پست لاروی میگوها به منظورهای متفاوت از جمله بهبود کیفیت لاروها (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۲)، کنترل پاتوژنهای باکتریایی در

[31] Fenneropennaeus indicus

هچری (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۱) و تحریک سیستم ایمنی به منظور پیشگیری در برابر بیماری ویروسی لکه سفید (WSD)[۳۲] انجام شده است (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۶).

از آرتمیای غنی سازی شده با عصاره متانولی چند گونه گیاه دارویی، به منظور کاهش بار آلودگی باکتریایی در مرحله پست لاروی میگوی منودون استفاده شده است (Citarasu و همکاران، ۲۰۰۳).

Babu و همکارانش (۲۰۰۸) از آرتمیای غنی سازی شده به وسیله دو گونه گیاه دارویی به نامهای علمی *Withania somnifera* و *Mucuna pruriens* به منظور بررسی وضعیت تولید تخم، شکوفایی تخم ها، کیفیت لاروهای به دست آمده در گروههای تیمار و مقایسه آنها با گروه شاهد مطالعه شده است.

از عصاره های چند گیاه دارویی و دو جلبک دریایی به نامهای *Sargassum wightii* و *Ulva lactuca* در غنی سازی آرتمیا استفاده شده و سپس آرتمیای غنی سازی شده در تغذیه بچه میگوهای سفید هندی مورد استفاده قرار گرفته است و اثرات آن در بهبود رشد و بازماندگی و کاهش بار آلودگی باکتریایی بررسی شده است.

از یک محصول گیاهی به نام Livol نیز که محصولی طبیعی از تعدادی گیاه دارویی است در غنی سازی آرتمیا استفاده شد و آرتمیای غنی سازی شده به منظور بهبود هضم مواد غذایی و بهتر شدن وضعیت رشد مراحل لاروی ماهیان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Uinkrishnan، ۱۹۹۵؛ Jayaprakas و Euphrasia، ۱۹۹۶).

[32] White Spot Disease

۳- مواد و روش کار

۳-۱- وسایل و مواد مورد نیاز

۳-۱-۱- مواد مورد نیاز جهت بررسی فعالیت آنتی باکتریایی

محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA)[۳۳]، تریپتیک سوی براث (TSB)[۳۴]، مولر هینتون آگار (MHA)[۳۵]، مولر هینتون براث (MHB)[۳۶]، تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار (TCBS)[۳۷] (کلیه محیط های کشت محصول شرکت مرک - آلمان)، اتانول، متانول، کلروفرم، نمک سدیم کلراید، سوآپ، پلیت پلاستیکی استریل، پنبه، آب مقطر، آب دیونیزه، میکروتیوب، فویل آلومینیومی، آمپول لیوفلیزه گونه های باکتری (سازمان پژوهشهای صنعتی قارچ و باکتری ایران)

۳-۱-۲-مواد مورد نیاز جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانی

ویتامین C، پودر DPPH[۳۸] (محصول شرکت سیگما کشور ایالات متحده)، حلالهای اتانول، متانول، کلروفرم (هر سه ساخت شرکت مرک آلمان)

۳-۱-۳- مواد مورد نیاز جهت بررسی فعالیتهای رشد و بقای بچه میگو و چالش با باکتری

غذای میگو (غذای تجاری از شرکت هوواراش، بوشهر، ایران- سایز ۰/۱ و ۰/۲ میلی متر)، سیست آرتمیا (شرکت INVE, Belgium)، باکتری ویبریو هاروه ای (PTCC ۱۷۵۵)، آب دریای فیلتر شده

۳-۲-تجهیزات و وسایل مورد نیاز

تجهیزات نمونه برداری، آماده سازی و عصاره گیری از جلبکها (قایق صیادی، چنگک، چاقو، دستگاه سوکسله، دستگاه تبخیر کننده چرخان[۳۹]، بشر، ویال، لوله آزمایش، پتریدیش و سایر ظروف شیشه ای)، تجهیزات نگهداری میگو (تانک های نگهداری میگو و آب، آکواریوم‌های پلاستیکی، دستگاه‌های هواده، سنگ هوا، سرب)، تجهیزات مورد نیاز جهت شکوفایی و غنی سازی آرتمیا (مخازن مخروطی شکل، ظروف پلاستیکی، سنگ و شلنگ هوا، لوپ، میکروسکوپ) یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد (یخساران، ایران)، ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی، حمام آب یا بن ماری (Julabo، آلمان)، تجهیزات مورد نیاز جهت تستهای باکتری شناسی و سنجش اثرات آنتی اکسیدان جلبکها (دستگاه انکوباتور یخچال دار مدل JSBI-250C, JSR Korea، دستگاه انکوباتور شیکر دار مدل JSS-200-CL JSR Inc. Korea، دستگاه کولیس دیجیتال مدل

---

[33] Tryptic Soy Agar
[34] Tryptic Soy Broth
[35] Muler Hinton Agar
[36] Muler Hinton Broth
[37].Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar
[38]. 2,2΄-diphenyl-1-pricryl hydrazyl
[39]. Rotary

GB/T14899-94، دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار مدل 3-16PK, Sigma Inc، کولیس دیجیتال مدل Guanglu, China، دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل England، Uv-Vis SpectropHotometer 6800 Jenwey Inc، اتوکلاو مدل Astell، انگلستان، ارلن، بشر، لوله آزمایش، راک، سر سمپلر زرد، پوار، توری و سه پایه، سوزن، پیپت، لوله آزمایش، پنس، لوپ سیمی، محلول استاندارد مک فارلند، لوله فالکن، ظروف شیشه ای درب دار، مگنت)

۳-۳- روش کار

۱-۳-۳- تهیه و آماده سازی جلبکها

-نمونه برداری و شناسایی جلبکها

در فاصله زمانی ماههای آذر و اسفند از مناطق بین جزر و مدی و یا پایین جزر و مدی سواحل استان بوشهر و به طور خاص مناطق بندرگاه، ریشهر، کنار اسکله های جلالی و جفره، پارک دانشجو، پارک ساحلی مرجان اقدام به جمع آوری دستی جلبکهای پرسلولی تازه از دریا شد، یا با رفتن به وسیله قایق به منطقه علفدون واقع در مجاورت جزایر شیف و عباسک توسط چنگک تعدادی دیگر از گونه های جلبکی جمع آوری شدند (شکلهای ۳-۱ و ۳-۲). مناطق جمع آوری گونه های مختلف در جدول ۳-۱ به همراه مختصات جغرافیایی آنها آورده شده است.

پس از جمع آوری و حمل آنها به آزمایشگاه، قسمتهای نکروزه برداشته و جلبکها با آب شیرین به خوبی چندبار شستشو شدند تا گل و لای و موجودات اپی فیت آنها کاملا تمیز شود (تصاویر ۳-۳ و ۳-۴)، پس از تمیز شدن کامل جلبکها، با پهن کردن آنها در محوطه آزمایشگاه به مدت ۱۰ روز مبادرت به خشک کردن آنها شد در ضمن قبل از خشک شدن نمونه هایی از هر جلبک برای شناسایی در فرمالین ۵٪ نگهداری شد (قرنجیک و همکاران، ۱۳۹۰). به منظور شناسایی جلبکهای جمع آوری شده از رفرنسهای معتبر (قرنجیک و روحانی ۱۳۸۹؛ Borgesen، ۱۹۳۹؛)؛ و کمک کارشناسان مرکز تحقیقات آبهای دور (چابهار) و مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان بوشهر استفاده شد.

شکل ۳- ۱: جمع آوری جلبکها به وسیله چنگک

شکل ۳- ۲: جمع آوری جلبکهای دریایی در منطقه بین جزر و مدی به وسیله دست

شکل ۳- ۳: شستشوی اولیه جلبکهای دریایی با آب شیرین

شکل ۳- ۴: شستشوی ثانویه جلبکهای دریایی با آب شیرین

-عصاره گیری از جلبکها

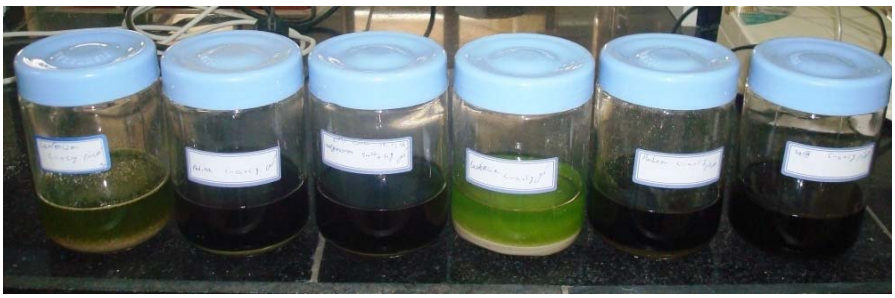
به منظور عصاره گیری از جلبکهای مختلف دریایی، ابتدا جلبکهای خشک شده توسط آسیاب برقی به قطعات ریز تبدیل شده و سپس به وسیله هاون پودر شدند (شکل ۳-۵) تا برای عصاره گیری آماده شوند.

شکل ۳- ۵: پودر جلبکهای خشک شده توسط آسیاب برقی

برای تهیه عصاره از روش خیساندن[40] (Choudhury و همکاران، ۲۰۰۵) با کمی تغییر در حجم حلالها استفاده شد به این صورت که مقدار ۲۰۰ گرم پودر از هر نوع جلبک و در سه تکرار به ۱۰۰۰ میلی لیتر (۵:۱) حلال اضافه شد، برای تهیه عصاره های اتانولی، متانولی و کلروفرمی، مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و هر چند ساعت یکبار بوسیله یک میله شیشه ای هم زده می شد؛ اما عصاره آبی با حرارت دادن

40. Soaking

مخلوط به مدت ۴۰ دقیقه حاصل شد و یا به وسیله سوکسله و مدت زمان ۸ ساعت انجام شد (شکلهای ۶-۳ و ۷-۳).



شکل ۳- ۶: تهیه عصاره جلبکها به روش خیساندن

شکل ۳- ۷: تهیه عصاره جلبکها به روش سوکسله

پس از مدت ذکر شده محلول رویی با دقت جمع آوری شده و پس از عبور از کاغذ صافی (کاغذ واتمن شماره ۱) (شکل ۳-۸) جهت حذف حلال از دستگاه روتاری (تقطیر در خلاء) در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. مدت زمان استفاده از دستگاه روتاری برای عصاره آبی ۶ ساعت و برای سایر عصاره ها ۲ ساعت بود. در نهایت عصاره های بدست آمده در پتریدیش های تمیز، زیر هود لامینار قرار گرفت تا بقیه حلال باقیمانده نیز تبخیر شود.

شکل ۳- ۸: صاف کردن عصاره های تولید شده به روش خیساندن یا سوکسله توسط کاغذ صافی

میزان عصاره به دست آمده به منظور تعیین درصد آن مورد توزین قرار گرفت. برای توزین عصاره ها، ابتدا پتریدیشهای خالی توزین شده و از وزن پتریدیش ها پس از خشک شده کامل عصاره ها در زیر هود لامینار کم شد تا وزن خالص و خشک هر عصاره به دست آمده حاصل شود. برای همه حلالها از سه تکرار استفاده شد و قبل از روتاری کردن تکرارهای هر تیمار با هم مخلوط می شدند. عصاره ها به میزان $50 mg\ ml^{-1}$ در حلال مربوطه حل شده و تا استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (شکل ۳-۹).

شکل ۳- ۹: برگرداندن عصاره های توزین شده به حلال خود جهت نگهداری در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد

۴-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره ها

به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی نمونه گیری و شناسایی شده از سه روش آزمون حساسیت ضدمیکروبی (آنتی بیوگرام)[۴۱]، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[۴۲]) و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC[۴۳]) استفاده شد.

۱-۴-۳- باکتریهای مورد آزمون

از باکتری های گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* (PTCC۱۰۲۳)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC ۱۳۳۷) و با کتریهای گرم منفی *اشریشیا کولی* (PTCC۱۳۹۷)، *ویبریو هاروه ای* (PTCC۱۷۵۵) با شناسه ثبت در بانک جهانی ژن (GU 974342, 1) که پیش تر توسط پژوهشکده میگو جداسازی و خالص سازی گردیده بود و از سازمان پژوهشهای صنعتی قارچ و باکتری ایران تامین شدند. *ویبریو آلژینولیتیکوس* مورد استفاده در این بررسی از آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای پژوهشکده میگوی کشور واقع در استان بوشهر تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت. برخی از باکتریهای مورد استفاده در این مطالعه پاتوژن و تعدادی نیز غیر پاتوژن بودند.

۲-۴-۳- تعیین اثر عصاره جلبکها به روش انتشار در آگار[۴۴] یا روش چاهک[۴۵] در شرایط برون تن[۴۶]

آمپول لیوفلیزه باکتریهای تامین شده زیر هود لامینار در شرایط استریل باز شده وبه محیط کشت TSB انتقال یافت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. از این کشت باکتری به عنوان منبع باکتری در همه آزمونها استفاده شد.

به منظور انجام تست ضدباکتریایی به روش دیسک دیفیوژن از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط کشت TSB سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از لوپ بر سطح مولر هینتون آگار، کشت یکنواختی از باکتریها انجام شد. سپس دیسک های بلانک (۶/۴ میلی متر- ساخت شرکت پادتن طب) که با ۵۰ میکرولیتر از عصاره های مختلف از جلبکهای دریایی (طی چندبار به نحوی که حداکثر عصاره ممکن به دیسک ها منتقل شود) استریل (بوسیله فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرون) آغشته شده بود (شکل ۱۰-۳) و حلال (DMSO) آنها خشک شده بود به وسیله پنس استریل در جاهای مناسب پلیت قرار داده شد. در ابتدا پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال (۴°c) نگه داشته شد و بعد از این مرحله به انکوباتور منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. برای هر عصاره سه تکرار انجام شد و از DMSO استریل شده به عنوان کنترل منفی و دیسک اکسی تتراسایکلین (۲۰µl/disk) تهیه شده از شرکت ایران دارو به عنوان کنترل

---

[41] Antimicrobial Susceptibility Testing (Antibiogram)
[42] Minimum Inhibitory Concentration
[43] Minimum Bactricidal Concentration
[44] Disk Diffusion
[45] Well Mathod
[46] Invitro

مثبت استفاده شد. هاله های عدم رشد اطراف دیسکها با کولیس اندازه گیری و به صورت میانگین گزارش شد (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸).

شکل ۳- ۱۰: روش تهیه دیسکهای حاوی عصاره های جلبکی

در روش چاهک نیز پس از آماده کردن سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند، کشت یکنواختی از باکتریها در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. سپس به وسیله میله شیشه ای استریل چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در سطح پلیت ها ایجاد شد و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت $50 mg\ ml^{-1}$ هر عصاره در چاهک ها ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. به منظور کنترل مثبت نتایج آزمون از اکسی تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت و از حلال به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هاله های عدم رشد اطراف دیسکها با کولیس اندازه گیری و به صورت میانگین گزارش شد (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸).

۳-۴-۳- تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتریها از روش رقت های متوالی در لوله استفاده شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶). ابتدا از هر عصاره غلظت mg/ml ۶۴ در حلال DMSO ساخته شد و برای استریل شدن از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی گذرانده شد؛ و برای هر عصاره به ازای هر میکروارگانیسم از یک سری ۱۲ تایی لوله های آزمایش استریل شده استفاده شد ده لوله برای غلظتهای مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (واجد باکتری و فاقد عصاره) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (واجد عصاره و فاقد باکتری) در نظر گرفته شد. به هر کدام از لوله ها به میزان ۹ میلی لیتر از محیط کشت MHA همراه با غلظت معینی از عصاره (۶۴-۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) در لوله های شماره یک تا ده و یک میلی لیتر از سوسپانسیون کشت یک شبه باکتری اضافه شد. بدین ترتیب غلظت عصاره در لوله های یک الی ۱۰ به ترتیب ۶۴ تا ۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. لوله ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون لوله

ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند، کمترین غلظت عصاره که باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) انتخاب شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶).

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) یک میلی لیتر از لوله هایی که باکتری در آنها رشد نکرده بود، روی محیط کشت MHA کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان انکوباسیون کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در پلیت رشد نکرده بود، به عنوان غلظت MBC آن عصاره برای میکروارگانیسم خاص در نظر گرفته شد (جلالی و همکاران، ۱۳۸۶).

۵-۳-تعیین اثر آنتی اکسیدانی عصاره جلبکهای دریایی در شرایط برون تن

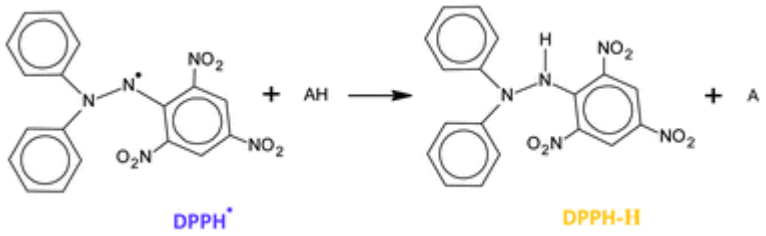
فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف جلبکهای دریایی به روش آزمون DPPH•[47] انجام شد. اندازه گیری فعالیت برداشت رادیکالهای آزاد عصاره های جلبکی به وسیله اندازه گیری DPPH• و به روش فتومتری تعیین شد (Kuda و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از رادیکال پایدار DPPH•، برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس ها و عصاره های گیاهی، کاربرد زیادی دارد. حرکت الکترون در سرتاسر مولکول سبب می شود که رادیکال آزاد پایدار DPPH•، نتواند به صورت دایمر درآمده و تولید رنگ بنفش کند. این رادیکال آزاد چربی دوست بوده و دارای بیشترین جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. ۰/۲ میلی لیتر محلول عصاره جلبکی با همین حجم اتانول مخلوط شده و سپس ۰/۰۲۵ میلی لیتر از محلول متانولی یک هزارم مول DPPH به آن اضافه شد، پس از نیم ساعت انکوبه شدن در دمای اتاق، مقدار جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف نورسنج خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد و از حلال مربوطه هر عصاره به عنوان کنترل یا بلانک و از اسید اسکوربیک یا ویتامین C به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. RSA[48] یا فعالیت برداشت رادیکال آزاد به صورت درصد و براساس بی رنگ شدن محلول DPPH و از روش فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA(\%) = (Ablank - Asample) / Ablank \times 100$$

در این رابطه A_{sample} میزان جذب نمونه پس از نیم ساعت، A_{blank} میزان جذب کنترل می باشد. به منظور بررسی دقیق تر فعالیت آنتی رادیکالی عصاره جلبکها و مقایسه آنها با هم از فاکتور EC_{50}[49] استفاده شد که بیانگر مقداری از عصاره است که قادر است ۵۰ درصد از رادیکال آزاد (DPPH) موجود در محیط را خنثی کند (شکل ۳-۱۰). برای محاسبه فاکتور EC_{50} ابتدا نموداری از رابطه میان مقادیر غلظتهای عصاره و درصد جذب DPPH• رسم شد و با توجه به نمودار حاصل غلظتی از عصاره که قادر به خنثی کردن ۵۰ درصد DPPH• بدست آمد (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷).

---

[47] 2,2´-diphenyl-1-pricryl hydrazyl
[48] Radical Scavenging Activity
[49] 50% Extract Concentration



شکل ۳- ۱۱: فرمول رادیکال آزاد DPPH و نحوه غیر فعال شدن آن

۶-۳- تهیه و غنی سازی آرتمیا

۱-۶-۳- تهیه و تفریخ سیست آرتمیا

سیست آرتمیا فرانسیسکانا (INVE, Belgium) از یک مرکز تکثیر در استان بوشهر تهیه شد. سیست خشک آرتمیا طبق روش استاندارد (Sorgeloos و همکاران، ۲۰۰۱) تفریخ شد. ابتدا سیستهای آرتمیا با محلول ۲۰۰ پی پی ام هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و سپس با آب شیرین به خوبی شستشو شدند تا باقیمانده ماده ضدعفونی کننده به طور کامل برداشته شود. ۵۰ گرم و ۷۰ گرم سیست آرتمیا در ۱۰ لیتر آب دریای (۳۵ppt) اتوکلاو شده، در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد و هوادهی شدید و مداوم و یک رژیم نوری (۲۰۰۰ لوکس) مداوم در مدت ۲۴ ساعت در دو ظرف استوانه ای مخروطی تفریخ شدند. پس از تفریخ، ناپلی های مرحله اینستار I با استفاده از خاصیت نورگرایی مثبت آنها از پوسته ها جداسازی و جمع آوری شدند و با استفاده از صافی ۱۲۰ میکرونی و آب شیرین شستشو و برای آزمونهای بعدی آماده شدند.

ب-۴-۲- بررسی اثر سمیت عصاره های مختلف جلبکهای دریایی برای آرتمیا

به منظور بررسی اثر سمیت عصاره های مختلف تهیه شده از جلبکهای مختلف طبق روش Coldwell و همکاران (۲۰۰۳) با کمی تغییر اقدام شد. ۱۰ عدد ناپلی زنده و فعال مرحله اینستار ۱ بوسیله پیپت پاستور در ویال حاوی ۹ میلی لیتر آب دریای استریل (شوری ۳۵ppt) قرار داده شد و به هر ویال یک میلی لیتر عصاره جلبکهای انتخاب شده که در DMSO با غلظتهای ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم در میلی لیتر حل شده بود اضافه شد. سمیت غلظتهای مختلف از عصاره های متفاوت جلبکهای دریایی انتخاب شده (بر اساس نتایج اثرات ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی) پس از ۲۴ ساعت و از طریق شمارش تعداد ناپلی های مرده و مقایسه آنها با گروه شاهد که فقط دارای DMSO بود محاسبه شد. هر گروه دارای سه تکرار بود و نتیجه ارزیابی سمیت عصاره های مختف جلبکها نسبت به ناپلی آرتمیا به صورت غلظت کشنده ۵۰٪ جمعیت (LC_{50})[50] و با کمک روش آماری آنالیز پروبیت[51] بیان شد.

[50] 50% Lethal Concetration
[51] Probit Analysis

۲-۶-۳- غنی سازی ناپلی آرتمیا

۲۴ ساعت پس از انکوباسیون سیست آرتمیا، ناپلی مرحله اول (اینستار I) پدیدار می گردد که در این مرحله به دلیل بسته بودن مخرج قادر به تغذیه نیستند؛ اما ۱۲ ساعت بعد لاروها پوست اندازی کرده و وارد مرحله دوم ناپلی (اینستار II) می شوند که در این مرحله تغذیه شروع شده و قادرند ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرون را مورد تغذیه قرار دهند. لذا این مرحله از ناپلی به عنوان حامل عصاره جلبکهای دریایی (بیوانکپسولیشن[۵۲]) در غنی سازی مورد استفاده قرار گرفت. غنی سازی طبق روش استاندارد (Sorgeloos و Kulasekarapandian، ۱۹۸۴) انجام شد. عصاره جلبک های انتخاب شده (بر اساس نتایج مراحل قبل) به نسبتهای مختلف ($0 mg\ ml^{-1}$، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰) در اتانول خالص حل شدند و از این محلول ها به عنوان ماده غنی ساز استفاده شد.

به منظور غنی سازی از بطریهای پلاستیکی ۱.۵ لیتری استفاده شد. این بطریها حاوی یک لیتر آب دریای استریل و ناپلی اینستار II با تراکم ۱۲۰-۱۰۰ ناپلی در میلی لیتر بود که ۲ میلی لیتر از ماده غنی سازی نیز به آن اضافه می شد دارای هوادهی ملایم بود به نحویکه ضمن حفظ میزان اکسیژن مورد نیاز، انتشار مواد غذایی هم در حد مناسب در محیط کشت وجود داشته باشد. هر تیمار دارای سه تکرار و طول مدت غنی سازی ۸ ساعت بود. ناپلیوسها پس از غنی سازی در الک ۱۲۰ میکرونی شستشو شده و مستقیما مورد استفاده میگوها قرار می گرفتند یا اینکه تا استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد با هوادهی ملایم قرار می گرفتند.

۳-۷- تهیه و نگهداری بچه میگوها

به منظور اجرای تحقیق تعداد ۱۰۰۰۰ عدد پست لارو میگوی سفید غربی[۵۳] ۱۲ روزه (PL_{12}[۵۴]) از یک مرکز تکثیر تجاری واقع در شهرستان دلوار (۳۰ کیلومتری محل آزمایش) در استان بوشهر خریداری و به سالن آزمایش که قبلا آماده سازی شده بود منتقل شدند. جهت انتقال پست لاروها از کیسه های نایلونی دوجداره حاوی یک سوم آب و دو سوم اکسیژن با شوری ۳۵ قسمت در هزار و در یونولیت های حاوی یخ و خاک اره استفاده شد.

پس از انتقال پست‌لاروها به سالن پرورش، به منظور پیشگیری از استرس پس از عملیات سازگاری پست لاروها به تانکها منتقل شدند. پس از شستن لایه بیرونی پلاستیک‌ها با آب شیرین ابتدا تمامی پلاستیک‌ها بدون اینکه باز شوند در درون آب تانک ذخیره به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا دمای آب درون پلاستیک‌ها با آب تانک، یکی شود (شکل ۲-۳). سپس در کیسه های حاوی بچه میگو که باز شده و بدون اینکه آب موجود در آن خالی شود، هر چند دقیقه یکبار مقداری از آب تانک به آب موجود در پلاستیک اضافه می‌شد تا پست لاروها کم کم به آب جدید عادت کنند، پس از چند دقیقه تمامی محتویات پلاستیک در دو تانک ۵۰۰ لیتری خالی شد. پس از تنظیم هوادهی، به مدت ۸ ساعت سالن آزمایش ترک و از غذا دهی به پست لاروها خودداری شد.

---

[52] Bioencapsulation
[53] *Litopenaeus vannamei*
[54] Post Larvae 12

شکل ۳- ۱۲: سازگارسازی پست لاروهای خریداری شده قبل از ذخیره سازی

تا شروع آزمایش بچه میگوها به مدت ۱۰ روز در این تانکها سازگاری پیدا کردند. طی شرایط سازگاری روزانه سه وعده از غذای پلت تجاری (شرکت هوواراش، بو شهر، ایران- سایز ۰/۱ میلی متر)، استفاده می کردند و هر ۲ روز یکبار، آب تانکها به میزان ۳۰ درصد تعویض و سیفون مواد غذایی باقیمانده و مدفوع انجام می شد. در ضمن آب جایگزین ۳۰ درصد آب دریا (شوری ۴۰ppt) بود به نحوی که در پایان دوره سازگاری و طی زمان آزمایش از آب دریا استفاده می شد. سعی شد دمای آب طی زمان دوره سازگاری و آزمایش در دامنه ۱/۵± ۲۹ حفظ شود.

۸-۳- تعیین اثر عصاره جلبکهای منتخب بر کاهش بار آلودگی باکتریایی در شرایط درون تن[55]

عصاره های جلبکهایی که در آزمایشگاه اثرات بازدارندگی خوبی داشتند و همچنین برای موجود زنده نیز سمیت کمی داشتند (نتایج آزمون سمیت عصاره ها برای آرتمیا) برای این قسمت کار انتخاب شدند. از باکتری *V.harveyi* نیز که در شرایط طبیعی قادر به ایجاد مشکل در سیستم تکثیر و پرورش میگو است به عنوان عامل آلوده کننده به صورت تجربی انتخاب شد.

۱-۸-۳-تهیه و آماده سازی باکتری

از کلنی های تکی باکتری *V.harveyi*، ۱۸ ساعته روی محیط TSA نمکی (۲٪) توسط لوپ استریل به ویالهای حاوی ۱۰ میلی لیتر آب دریای فیلتر شده (۰/۲ میکرون) اضافه شد تا در OD_{540} عدد یک به دست بیاید، این غلظت تقریبا برابر 10^{9} [56] CFU ml^{-1} می باشد (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸). سپس این سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ شد (۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) آنگاه مایع رویی دور ریخته شد و سلولهای باکتری ته

[55] *Invivo*
[56] .Colony Forming Unit

نشین شده دوباره در ۱۰ میلی لیتر آب دریای فیلتر شده حل شد و با روش رقت سازی سریالی غلظتهای کمتر ($۱۰^{۸}$، $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۵}$) مورد نیاز تهیه و برای آلوده کردن بچه میگوها استفاده شد.

۲-۸-۳- تعیین دز کشنده ۵۰٪ (LD_{50})[57] باکتری *V.harveyi* برای میگوی وانامی

قبل از استفاده از باکتری *V.harveyi* در آکواریوم حاوی میگو و در آزمایش اصلی، به منظور رسیدن به دز تحت حاد باکتری، ابتدا پاتوژنیسیتی[58] باکتری مذکور برای میگوهای مورد استفاده طبق روش Aguirre-Guzman و همکاران (۲۰۰۵) بررسی شد. تعداد ۳۰ عدد بچه میگوی سالم (۰/۰۳ -۰/۰۲ گرم) که در آکواریومهای پلاستیکی (با هوادهی، شوری ۴۰ppt و دمای ۱±۲۸ درجه سانتیگراد) نگهداری می شدند، به سطلهای (شکل) حاوی باکتری با دزهای مختلف ($۱۰^{۹}$CFU ml^{-1}، $۱۰^{۸}$، $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۵}$) منتقل شده و به مدت ۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. بعد از این مدت میگوها پس از شستشو با آب استریل شده دریا به آکواریومهای قبلی برگردانده و میزان تلفات طی ۹۶ ساعت پایش و ثبت شد. هر دز دارای سه تکرار بود و طی دوران پایش، میگوها روزی دوبار توسط غذای تجاری تغذیه شده و روزانه تلفات هر آکواریوم جمع آوری و ثبت می شد، در این زمان هیچ تعویض آبی انجام نشد. LD_{50} با کمک روش آماری آنالیز پروبیت و رسم نمودار مربوطه (محور افقی مربوط به دز و محور عمودی مربوط به میزان تلفات) محاسبه شد.

شکل ۳- ۱۳: باکتریهای شستشو شده و سانتریفیوژ شده

۳-۸-۳- شرایط و روش آزمایش

بر اساس نتایج LD_{50} باکتری *ویبریو هاروه ای* از دز $۱۰^{۷}$CFU/ml برای آلوده سازی بچه میگوهای مورد پرورش استفاده شد. تعداد ۳۶۰۰ عدد پست لارو ۲۵ روزه میگوی وانامی با میانگین وزنی ۰/۸۸ ± ۶ میلی گرم و میانگین طولی ۲/۴ ± ۱۰/۶ میلی متر در ۱۲ تیمار و ۳۶ تکرار که هر تکرار دارای ۱۰۰ عدد پست لارو بود، طبق جدول

[57] .50% Letal Dose
[58] Pathogenicity

شماره ۳-۱ در آکواریومهای پلاستیکی تغذیه شدند. بر اساس نتایج آزمونهای تعیین اثرات ضدباکتریایی، آنتی اکسیدانی و تعیین سمیت عصاره های جلبکی، تنها عصاره های اتانولی ۴ جلبک انتخاب شده، با غلظتهای مختلف از ۶۰۰mg/l - ۲۰۰ به شرح جدول ۳-۱ جهت ادامه مطالعه در شرایط درون تن انتخاب شدند.

جدول ۳- ۱: تیماربندی بچه میگوهای تحت آزمایش

نام گروه	تعریف	شرایط آزمایش
C+	کنترل مثبت	آرتمیای غنی سازی نشده + *ویبریو هاروه ای*
C-	کنترل منفی	آرتمیای غنی سازی نشده، بدون ویبریو هاروه ای
S (۲۰۰)	سارگاسوم (۲۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
S (۴۰۰)	سارگاسوم (۴۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
S (۶۰۰)	*سارگاسوم* (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
L (۲۰۰)	لورنسیا (۲۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
L (۴۰۰)	لورنسیا (۴۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
L (۶۰۰)	لورنسیا (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
G (۳۰۰)	*گراسیلاریا* (۳۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
G (۶۰۰)	گراسیلاریا (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + *ویبریو هاروه ای*
K (۳۰۰)	کاپافیکوس (۳۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای
K (۶۰۰)	کاپافیکوس (۶۰۰mg/l)	آرتمیای غنی سازی شده + ویبریو هاروه ای

تیمارهای فوق به مدت ۳۰ روز نگهداری تحت شرایط دمایی ۲±۲۹ درجه سانتیگراد، شرایط شوری ۱/۵±۴۲ نگهداری شد و روزانه ۳ بار در ساعات ۸، ۱۴ و ۲۲ طبق جدول ۳-۲ غذادهی انجام شد و به منظور حفظ کیفیت آب پرورش هر دو روز یکبار ۲۰٪ آب تعویض می شد.

جدول ۳- ۲: برنامه زمانی و مقدار غذادهی گروه کنترل و سایر تیمارهای مورد آزمون.

ساعات غذادهی	نوع غذا	درصد غذادهی
۸ صبح	غذای تجاری پلت	۲۵٪ جیره کل
۲ بعد از ظهر	آرتمیای غنی شده/غنی نشده	۵۰٪ جیره کل
۱۰ شب	غذای تجاری پلت	۲۵٪ جیره کل

به منظور ایجاد آلودگی مصنوعی در محیط پرورش، میگوی همه تیمارها به جز تیمار کنترل منفی، در روز اول پرورش به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی $۱۰^{۷}$CFU/ml باکتری *ویبریو هاروی* قرار گرفته، سپس به محل پرورش برگردانده شدند و پس از هر تعویض آب ۱۰ میلی لیتر از همین دز باکتری به آب پرورش میگوهای مورد آزمون (به جز کنترل منفی) اضافه می شد (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

۴-۸-۳-روش نمونه برداری و تعیین بار آلودگی

هر ۱۰ روز از تعدادی از میگوهای مورد آزمایش (۵ عدد از هر تکرار) به صورت تصادفی نمونه گیری شد. نمونه ها پس از غوطه وری در محلول ۵۰ پی پی ام فرمالین به منظور از بین بردن باکتریهای سطحی بدن میگوها و سپس شستشوی با آب استریل (جهت از بین بردن باقیمانده محلول ضدعفونی کننده) در ۵ میلی لیتر محلول نرمال سالین هموژن شده و به روش لوله های متوالی تا 10^{-5} رقیق شدند. نیم میلی لیتر از این نمونه رقیق شده به وسیله پیپت استریل برداشته و به محیط کشت TCBS اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری (۳۰ درجه سانتیگراد) شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود. پس از انکوباسیون کلونیهای باکتریهای رشد کرده به کمک شمارشگر دیجیتال شمارش شده و طبق فرمول زیر میزان باکتریهای موجود در هر گرم بافت میگو محاسبه شد.

وزن نمونه (g) / فاکتور رقت × تعدادکلونیهای شمارش شده = تعداد باکتری ($CFU\ g^{-1}$)

۹-۳- تعیین درصد بقای بچه میگوها و فاکتورهای رشد

در پایان ۳۰ روز پرورش با شمارش میگوهای زنده و بر اساس روش (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۱) درصد بازماندگی میگوها (فرمول ۱) محاسبه شد. شاخص های رشد در هر تیمار با اندازه گیری طول و وزن نهایی میگوها محاسبه شد. میزان وزن کسب کرده طی دوران پرورش از طریق کم کردن وزن اولیه از وزن نهایی به دست آمد و نرخ رشد ویژه به روش (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۱) و از طریق فرمول ۲ محاسبه شد.

فرمول ۱: تعدادمیگوی اولیه / ۱۰۰ × (تعداد میگوی زنده ثانویه) = بازماندگی (٪)

فرمول ۲: روزهای پرورش / ۱۰۰ × (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن ثانویه) = نرخ رشد ویژه (٪)(SGR)

۱-۹-۳-تعیین میزان مقاومت میگوها در برابر عامل پاتوژن (*V.harveyi*)

پس از پایان دوره آزمایش قبلی ۱۰ عدد از میگوهای باقیمانده هر تکرار را به صورت تصادفی انتخاب کرده و در آکواریومهای ضد عفونی و شستشو شده، با همان نام تیمار قبلی ذخیره سازی شد، شرایط پرورش و تغذیه بدون افزودن باکتری به مدت ۱۰ روز دیگر ادامه پیدا کرد. پس از این ۱۰ روز کلیه تیمارها با دز کشنده *ویبریو هاروی* (۳×۱۰^{۸}cfu/ml) به مدت ۲ ساعت مواجهه[59] داده شدند، سپس به آکواریومهای مورد پرورش برگردانده شدند و میزان تلفات هر ۱۲ ساعت و طی یک هفته پایش و ثبت شد، طی این مدت میگوها همچنان با جیره غذایی سابق مورد تغذیه قرار می گرفتند و هر دو روز یکبار تعویض آب و سیفون مدفوع، پوسته ها و مواد غذایی باقیمانده انجام می شد. درصد تلفات از فرمول زیر محاسبه شد (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲).

[59]. Challenge

۱۰۰ × (A–تعداد میگوهای اولیه) / (A– تعداد میگوهای مرده) = تلفات تجمعی (٪)

در فرمول بالا، A مساوی تعداد میگوهای مرده در روز اول چالنج می باشد که این تلفات معمولا بر اثر استرس وارده اتفاق می افتد (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲). با استفاده از فرمول زیر درصد محافظت کننده نسبی (PRP)[60] مربوط به هر عصاره در برابر عامل بیماری نیز محاسبه شد.

PRP% = (٪ تلفات در گروه کنترل/ تلفات در گروه تیمار٪)–۱× ۱۰۰

۱۰-۳- آنالیز آماری داده ها

بررسی نتایج آزمونها و مقایسه میانگین داده ها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه[61] و از نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها در این آزمون نیز از روش حداقل تفاوت های معنی دار (LSD)[62] استفاده شد و P< ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده های فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی از آزمون توکی (Tucky HSD) استفاده شد. رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Office Excel 2007 انجام شد.

[60] .Percent Relative Protection
[61] One Way ANOVA
[62] Low Significant differentiation (LSD)

۴-نتایج شناسایی و آماده‌سازی جلبک‌های دریایی

۴-۱- نتایج شناسایی جلبک‌های دریایی

۴ گونه مختلف، از ۱۰ مرحله نمونه‌گیری از ۵ ایستگاه در اطراف شهر بوشهر به دست آمد که این جلبک‌ها شامل ۶ جنس بود که در سه گروه عمده، جلبک‌های سبز (*Codium*)، جلبک‌های قرمز (*Gracilaria, Laurencia, Kapaphycus*) و جلبک‌های قهوه‌ای (*Sargassum, Padina*) قرار می‌گرفتند. نام گونه و مختصات جغرافیایی محل نمونه‌گیری هر یک از جلبک‌ها در جدول ۴-۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۴- ۱: گونه‌های جداسازی شده در فصول و ایستگاه‌های مختلف از سواحل شهرستان بوشهر

نام کلاس	نام گونه	محل نمونه‌گیری	مختصات جغرافیایی	فصل نمونه‌گیری
Cholorophyta جلبک سبز	*Codium iyengarii*	ری‌شهر	۲۸° ۵۱′ ۴۹″N ۵۰° ۵۱′ ۳۶″ E	زمستان
Rodophyta جلبک قرمز	*Gracilaria corticata*	اسکله جفره	۲۸° ۵۷′ ۴۳″ N ۵۰° ۵۱′ ۴۹″ E	زمستان
	Laurencia snyderiea	ری‌شهر	۲۸° ۵۱′ ۴۹″ N ۵۰° ۵۱′ ۳۶″ E	زمستان
	Kappaphycus alvarezii	ری‌شهر	۲۸° ۵۱′ ۴۹″ N ۵۰° ۵۱′ ۳۶″ E	زمستان
Phaeophyta جلبک قهوه‌ای	*Sargassum ilicifolium*	جزیره عباسک	۲۸° ۵۸′ ۴۲″ N ۵۰° ۵۰′ ۳۶″ E	پاییز
	Sargassum angustifolium	جزیره عباسک	۲۸° ۵۸′ ۴۲″ N ۵۰° ۵۰′ ۳۶″ E	پاییز
	Padina borgesseni	هلیله	۲۸° ۵۰′ ۱۶″ N ۵۰° ۵۲′ ۵۷″ E	زمستان

شکل‌های ۴-۱ الی ۴-۷ تصاویر جلبک‌های شناسایی‌شده به همراه نام علمی آن‌ها را نشان می‌دهد که به‌وسیله کلیدهای شناسایی معتبر و کارشناسان خبره مرکز تحقیقات چابهار و مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان بوشهر انجام‌شده است.

۴-۱-۱- شرح مختصری از خصوصیات مورفولوژی جلبک‌ها

- مشخصات جلبک *Sargassum angustifolium(Agardh 1948)*

سارگاسوم یک جنس از ماکرو جلبک‌ها، در رده جلبک‌های قهوه‌ای است که گونه‌های متعدد آن در سراسر مناطق معتدله و گرمسیری جهان گسترش دارند. گونه‌های این جنس بیشترین شباهت به گیاهان عالی خشکی‌ها دارند و ممکن است به طول چند متر برسند، رنگ این جلبک‌ها عمدتا قهوه‌ای یا سبز تیره بوده و از یک نگاه‌دارنده (Hold fast)، یک ساقه کوتاه و تشکیلات برگ مانند تشکیل‌شده‌اند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

رنگ گونه *S. angustifolium* قهوه‌ای متمایل به زرد است، محور اصلی، استوانه‌ای، کوتاه، محکم و به قطر ۵-۳ میلی‌متر بوده و دارای چندین انشعاب اولیه برخاسته از قاعده است. انشعابات اولیه استوانه‌ای، صاف، کشیده و باریک (قطر mm ۱/۵-۱) و دارای وزیکول‌های کروی پایه‌دار با رأس گرد می‌باشند (شکل ۸-۴). برخی از برگهای انشعابات فرعی بسیار کوتاه و باریک و دارای دندانه‌های کوتاه و نامنظم بوده و این‌گونه جلبکی به‌وسیله صفحات نگاه‌دارنده به بسترهای صخره‌ای می‌چسبد (Hamdy و Dawes، ۱۹۸۹).

شکل ۴- ۱: جلبک *Sargassum angustifolium* جداسازی شده از سواحل شهر بوشهر

- مشخصات جلبک (Agardh 1948) (*Sargassum ilicifolium*)

رنگ این‌گونه قهوه‌ای متمایل به زرد است. محور اصلی آن گرد و با چندین انشعاب اولیه است. ساختار ساقه مانند استوانه‌ای و صاف با صفحه کوچک گوه‌ای هست، دارای چندین انشعاب از کنار برگ‌ها هست. برگ‌ها در انشعابات اولیه مستطیلی شکل و کشیده، با دندانه‌های تیز در حاشیه می‌باشند که حدود دو تا سه سانتیمتر طول و ۵-۴ میلی‌متر پهنادارند. رگبرگ‌ها ظریف و نازک بوده اکثرا پیدا نیستند، برگهای روی انشعابات فرعی، مستطیلی تا اندکی نیزه‌ای با طول یک تا دو سانتیمتر و عرض ۴-۳ میلی‌متر و واجد روزنه‌های کوچک و پراکنده در سطح برگ‌ها می‌باشند. وزیکول‌های هوایی کروی، نوک‌تیز با قطر ۳-۲ میلی‌متر که روی یک‌پایه فشرده قرار دارند، ارتفاع تال آن‌ها به ۴۰-۳۰ سانتی‌متر می‌رسد. این جلبک‌ها در قسمت‌های پایینی و اعماق کم منطقه جزر و مدی و روی سطوح صخره‌ای می‌رویند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

شکل ۴- ۲: جلبک *Sargassum ilicifolium* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

-مشخصات جلبک *Laurencia snyderiae (Dawson 1966)*

این‌گونه در رده جلبک‌های قرمز قرار می‌گیرد. رنگ این‌گونه قهوه‌ای تیره تا ارغوانی است و بافت آن غشایی، سفت و اندکی شکننده است. انشعابات افراشته این‌گونه دارای تعداد زیادی برجستگی‌های پستانک مانند در طول محور اصلی هست (شکل ۹-۴). محور اصلی نیز مشخص و مجزا بوده که از صفحه نگاه‌دارنده برخاسته است و ارتفاع تال[۶۳] (اندام ساقه مانند) ۱۰-۵ سانتی‌متر است. محل رویش جلبک در ناحیه پایین محدوده بین جزر و مدی و روی سطح بسترهای صخره‌ای است (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

شکل ۴- ۳: جلبک *Laurencia snyderiae* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

[63] . Tallus

-مشخصات جلبک *Gracilaria corticata (Agardh 1948)*

گراسیلاریا نیز یک جنس از جلبک‌های قرمز است که به دلیل وجود میزان زیادی آگار در این جنس (آگاروفیت) و مصرف به‌عنوان غذای انسان واجد اهمیت اقتصادی زیادی است، به‌طوری‌که هم‌اکنون در بسیاری از کشورهای درحال‌توسعه در قاره‌های آسیا، آمریکای جنوبی، آفریقا و اقیانوسیه کشت می‌شود (رضوی شیرازی، ۱۳۸۵).

طبقه‌بندی جلبک‌های راسته Graciariales هنوز غیر شفاف است و به شکل واقعی مشخص نشده ولی چیزی که مشخص است این است که بیش از ۱۰۰ گونه از این گروه فقط در جنس *Gracilaria* قرارگرفته است که عمدتا در نواحی معتدله و نیمه استوایی پراکنده هستند. رنگ گونه *G. corticata* متمایل به ارغوانی تا قهوه‌ای است. بافت جلبک به‌صورت غضروفی است و نمای آن بوته‌ای و به‌صورت بادبزنی با تقسیمات دوتایی نامنظم وجود دارد. این‌گونه در قاعده فشرده بوده و چندین محور اصلی از قاعده منشعب می‌گردد (شکل ۱۰-۴). این جلبک به‌وسیله نگاه‌دارنده صفحه‌ای به صخره می‌چسبد، محل رویش این‌گونه بیشتر حوضچه‌های صخره‌ای در قسمت‌های میانی و پایینی محدوده بین جزر و مدی است (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

شکل ۴- ۴: جلبک *Gracilaria corticata* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

-مشخصات جلبک *Padina boergeseni (Alender & Kraft 1939)*

پادینا یک جنس از جلبک‌های قهوه‌ای است که به‌صورت بوته‌ای رشد می‌کند. گونه *Padina boergeseni* به رنگ قهوه‌ای تیره است، دارای چندین لوب شکننده بادبزنی شکل بوده که واجد شکافهای عمیقی می‌باشند. لوب‌ها در قاعده باریک و به سمت بالا پهن می‌شوند (شکل ۴-۵). محل رویش این جلبک معمولا در محدوده منطقه بین جزر و مدی روی سطح بسترهای صخره‌ای است. برای چسبیدن به این سطوح از صفحات نگاه‌دارنده خود استفاده می‌کنند. در خلیج‌فارس طی فصول پاییز و زمستان دیده می‌شوند (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹).

شکل ۴- ۵: جلبک *Padina borgesseni* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

الف-۱-۱-۶-مشخصات جلبک *Kappaphycus alvarezii* (Tony 1897)

این جلبک گونه‌ای از جلبک‌های قرمز است که معمولا به رنگ سبز یا زرد دیده می‌شود (Paeula و همکاران، ۲۰۰۲). دارای ساختارهای ساقه مانند محکم، گوشتی و نرمی است که گاهی به طول دو متر می‌رسند، این ساختارها دارای انشعابات کوتاهی (۲-۱ سانتیمتر) می‌باشند که در قاعده تعداد آن‌ها کم می‌شود. این‌گونه جلبک بیشتر در مناطق گرمسیری دیده می‌شود که به خاطر رشد سریع و میزان قابل‌توجه کاراگینان، چند سالی است که پرورش آن موردتوجه قرارگرفته است (Paeula و همکاران، ۲۰۰۲).

شکل ۴- ۶: جلبک *Kappaphycus alvarezii* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

-مشخصات جلبک *Codium iyengarii* (Borgessen 1947)

جنس کودیوم از رده جلبک‌های سبز هست. گونه *Codium iyengarii* سبز تیره بوده و دارای بافتی گوشتی به شکل استوانه‌ای با انشعابات گرد هست که هر انشعاب به‌طور منظم دوشاخه می‌شود. این‌گونه دارای صفحه نگاه‌دارنده کوتاه هست. ارتفاع تال در این‌گونه ۲۵-۱۵ سانتی‌متر و قطر آن ۷-۳ میلی‌متر هست (قرنجیک و روحانی، ۱۳۸۹). محل رویش این جلبک بیشتر در قسمت‌های میانی تا پایینی محدوده جزر و مدی و بر روی بسترهای صخره‌ای است.

شکل ۴- ۷: جلبک *Codium iyengarii* جداسازی شده از سواحل شهرستان بوشهر

۲-۱-۴- نتایج عصاره گیری از جلبک‌های دریایی

درصد وزنی عصاره‌های مختلف جلبک‌های دریایی در جدول ۴-۲ نشان داده‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین درصد وزنی میزان عصاره به‌دست‌آمده به مقدار ۷/۷ درصد وزن خشک جلبک مربوط به عصاره کلروفرمی جلبک سبز *C.* iyengarii؛ و کمترین مقدار آن با میزان ۲/۵۴ درصد وزن عصاره خشک مربوط به عصاره آبی جلبک قرمز *L.* snyderiae بود.

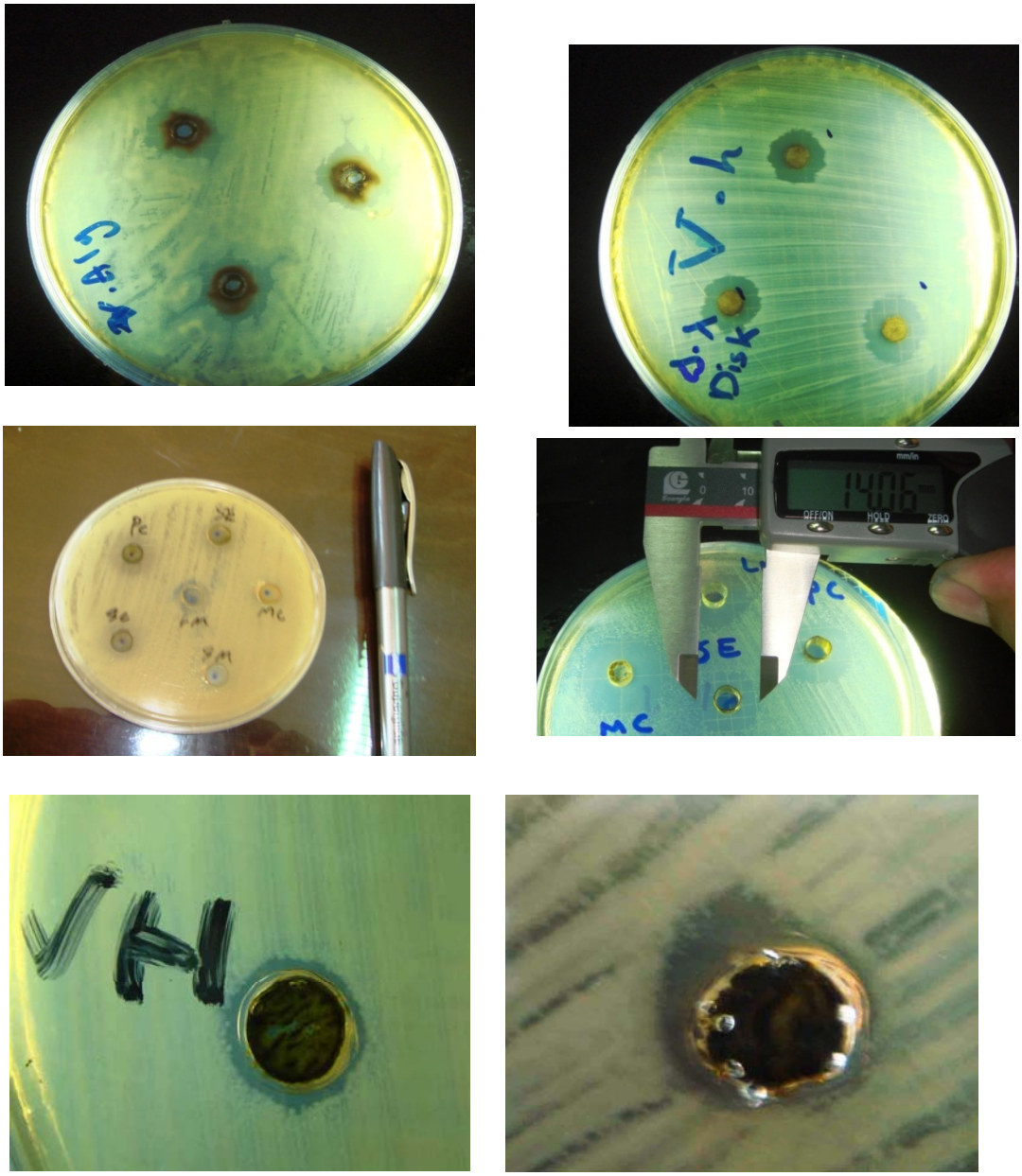
جدول ۴- ۲: میزان عصاره‌خشک به‌دست آمده و درصد آن‌ها نسبت به وزن خشک جلبک‌های دریایی مورد آزمون

نام علمی جلبک	حلال	وزن خشک جلبک (گرم)	وزن عصاره خشک (گرم)	عصاره (٪)
C. iyengarii	اتانول	۲۰۰	۹/۱۳	۴/۵۶
	متانول	۲۰۰	۱۲/۳۴	۶/۱۷
	کلروفرم	۲۰۰	۱۵/۴۱	۷/۷
	آب	۲۰۰	۱۰/۲۳	۳/۱۱
G. corticata	اتانول	۴۰۰	۲۳/۵۶	۵/۸۹
	متانول	۴۰۰	۲۴/۳۳	۶/۰۸
	کلروفرم	۴۰۰	۱۹/۱۸	۴/۷۹
	آب	۴۰۰	۱۸/۱۶	۲/۵۴
L. snyderiae	اتانول	۴۰۰	۲۶/۱۲	۶/۵۳
	متانول	۴۰۰	۲۱/۶	۵/۴
	کلروفرم	۴۰۰	۲۴/۴۵	۶/۱۱
K. alvarezii	اتانول	۳۵۰	۱۴/۷۶	۴/۲۲
S. ilicifolium	متانول	۳۵۰	۱۳/۴۹	۳/۸۵
	کلروفرم	۳۵۰	۱۶/۲۸	۴/۶۵
S. angustifolium	اتانول	۵۰۰	۳۵/۳۱	۷/۰۶
	متانول	۵۰۰	۳۴/۱۹	۶/۸۴
	کلروفرم	۵۰۰	۳۷/۱۴	۷/۴۳
	آب	۵۰۰	۳۰/۴۷	۳/۰۹
P. borgesseni	اتانول	۲۰۰	۸/۷۵	۳/۷۰
	متانول	۲۰۰	۷/۴۱	۴/۳۷
	کلروفرم	۲۰۰	۹/۶	۴/۸

۴-۲- نتایج آزمون‌های باکتری‌شناسی

۴-۲-۱- نتایج آزمون‌های حساسیت

نتایج نشان داد که اکثر عصاره‌های مختلف جلبک‌های دریایی اثرات ضد باکتریایی (باکتریوسید و باکتریواستاتیک) خوبی هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی داشتند، همچنین اثرات ضد باکتریایی هم در مورد باکتری‌های بیماری‌زا و هم باکتری‌های غیر بیماری‌زا دیده شد، نمونه‌هایی از اشکال اثرات آنتی باکتریال عصاره‌های جلبکی به‌صورت آزمون آنتی بیوگرام و به روش‌های انتشار در دیسک یا انتشار در چاهک در شکل ۴-۸ دیده می‌شود.



شکل ۴- ۸: اثر ضد باکتریایی برخی از عصاره‌های جلبک‌های جداسازی شده از سواحل خلیج‌فارس

خلاصه این نتایج در جدول شماره ۴-۳ درج‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تمامی عصاره‌های جلبک‌های قهوه‌ای *S.angustifolium* و *P.borgesseni* روی تمامی باکتری‌های مورد آزمون مؤثر بودند و عصاره‌های جلبک سبز *C. iyengarii* کمترین اثر ضد باکتریایی روی باکتری‌های مورد آزمون داشت. از میان عصاره‌های مختلف نیز به نظر می‌رسد، عصاره‌های کلروفرمی دارای اثرات ضد باکتریایی قوی‌تری بودند و عصاره‌های آبی اکثر جلبک‌ها فاقد اثرات ضد باکتریایی و یا در برخی موارد دارای اثرات بسیار کمی بود، لذا از درج آن‌ها در همه جداول صرف‌نظر شده است.

جدول ۴- ۳: فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف جلبک‌های دریایی خلیج‌فارس

جلبک دریایی	حلال	فعالیت ضد پاتوژن				
		V.harveyi	*V.alginolyticus*	*E.coli*	*B.subtilis*	*S.aureus*
S. angustifolium	اتانول	++	++	_	++	++
	متانول	++	++	_	++	+
	کلروفرم	+++	++	+	+++	++
S. ilicifolium	اتانول	–	_	_	NT	++
	متانول	–	_	NT	+	_
	کلروفرم	–	+	+	+	++
C. iyengarii	اتانول	–	_	+	++	+
	متانول	–	_	+	NT	_
	کلروفرم	–	+	NT	_	_
K. alvarezii	اتانول	++	+	_	NT	++
	متانول	++	+	+	++	NT
	کلروفرم	+	++	_	+	+++
L. snyderia	اتانول	++	++	++	+	+
	متانول	+++	++	++	NT	NT
	کلروفرم	+++	++	NT	++	++
G. corticata	اتانول	+++	+++	_	++	NT
	متانول	++	++	_	NT	NT
	کلروفرم	+++	++	_	NT	NT
P. borgessni	اتانول	–	_	_	++	+
	متانول	–	NT	_	++	++
	کلروفرم	–	+	NT	++	++

(–) بدون فعالیت ضد باکتریایی، (+) فعالیت ضد باکتریایی اندک (میلی‌متر ۷> قطرهاله)، (++) فعالیت ضد باکتریایی متوسط (قطرهاله = ۱۰-۷ میلی‌متر)، (+++) فعالیت ضد باکتریایی بالا (میلی‌متر ۱۰< قطرهاله)، (NT) آزمایش نشده.

جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰ فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف جلبک‌های دریایی را به‌صورت کامل‌تر و با جزئیات بیشتر، بر اساس اندازه قطرهاله عدم رشد بیان می‌کنند. همان‌طور که در جداول دیده می‌شود ویبریوهاروی به‌عنوان پاتوژن میگوها بیشترین حساسیت نسبت به عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* با قطر هاله عدم رشد ۲/۸±۱۶/۹ میلی‌متر از خود نشان داده و پس‌ازآن عصاره کلروفرمی جلبک *L.snyderiae* با هاله عدم رشد ۳±۱۶/۷ میلی‌متر قرار دارد، به‌طوری‌که این حساسیت‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (۰/۴±۱۳/۳) نیز بیشتر بود. از طرفی عصاره‌های آبی به‌جز در برخی موارد در اکثر مواقع اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون نداشتند (جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰). به‌جز عصاره‌های آبی کم اثرترین عصاره بر اصلی‌ترین

پاتوژن میگو (*V.harveyi*) عصاره متانولی جلبک *C. iyengarii* با هاله عدم رشد ۳/۵±۰/۵ بود. اثر سایر عصاره‌های جلبکی بر باکتری‌های مورد آزمون در جداول ۴-۴ تا ۴-۱۰ دیده می‌شود.

جدول ۴- ۴: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *S. angustifolium* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V.harveyi*	*V.alginolyticus*	*E.coli*	*B.subtilis*	*S.aurues*
اتانولی	۹/۴±۱/۸^{a}	۹±۱/۳^{a}	۰^{a}	۹/۲±۰/۸ ^{a}	۸/۸±۰/۶ ^{a}
متانولی	۸/۲±۲/۱^{a}	۷/۱±۲/ ۴ ^{a}	۰^{a}	۸/۲±۰/۹^{a}	۶/۵±۱/۷^{b}
کلروفرمی	۹/۴±۱/۴^{a}	۸/۳±۰/ ۴ ^{a}	۷/۷±۱/۲ ^{b}	۱۲/۲±۱/۷ ^{b}	۹/۵±۲/ ۶ ^{a}
آبی	۰^{b}	۰/۴±۰/ ۲^{b}	۰^{a}	۰/۲±۰/۱ ^{c}	۱/۲±۰/۳ ^{c}
OTC	۱۳/۳±۰/۴^{c}	۱۵/۴±۰/۵^{c}	۱۹/۷±۰/۳ ^{c}	۲۳/۴±۱/ ۴^{d}	۲۴/۶±۰/ ۸^{d}

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۵: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *S. ilicifolium* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V .alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۰ ^{a}	NT	۹/۸±۱/۶^{a}
متانولی	۰ ^{a}	۰^{a}	NT	۵±۰/۸^{a}	۰
کلروفرمی	۰ ^{a}	۴/۳±۰/۴^{b}	۶/۷±۱^{a}	۴/۲±۱/۳ ^{a}	۹/۵±۲/۳^{a}
آبی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	NT	۰/۵±۰/۱^{b}	NT
OTC	۱۳/۳±۰/ ۴ ^{b}	۱۵/۴±۰/۵^{c}	۱۹/۷±۰/۳^{b}	۲۳/۴±۱/۴^{c}	۲۴/۶±۰/ ۸^{b}

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۶: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *C. iyengrii* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V. alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۶/۵±۲/۱^{a}	۹/۵±۱/۸ ^{a}	۳/۸±۰/۶ ^{a}
متانولی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۵/۲±۰/۸ ^{a}	NT	۰^{b}
کلروفرمی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	۵/۲±۰/۶ ^{a}	NT	۰ ^{b}
آبی	۰ ^{a}	۰ ^{a}	NT	۱/۵±۰/۳^{b}	NT
OTC	۱۳/۳±۰/ ۴ ^{b}	۱۵/۴±۰/۵^{c}	۱۹/۷±۰/ ۳^{b}	۲۳/۴±۱/۴^{c}	۲۴/۶±۰/ ۸^{b}

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۷: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *K. alvarezii* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V. alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۹/۵±۱/۵ [a]	۵/۵±۲ [a]	۰ [a]	NT	۹±۰/۹ [a]
متانولی	۸/۵±۱/۷ [a]	۶±۱/۲ [a]	۳/۵±۱ [b]	۷/۵±۰/۸ [a]	NT
کلروفرمی	۶/۷±۱/۱ [a]	۷/۳±۰/۷ [a]	۱۴/۵±۱/۹ [c]	۷/۵±۲/۵ [a]	۱۴/۱±۱/۵ [b]
آبی	۱/۵±۱ [b]	۱ [b]	NT	۱/۶±۰/۲ [b]	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴ [c]	۱۵/۴±۰/۵ [c]	۱۹/۷±۰/۳ [d]	۲۳/۴±۱/۴ [c]	۲۴/۶±۰/۸ [c]

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۸: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *G. corticata* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V. alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۱۶/۹±۲/۸[a]	۱۷±۳/۳ [a]	۰ [a]	۹/۲±۰/۸[a]	NT
متانولی	۹/۲±۲/۱ [b]	۷/۱±۲/۴[b]	۰ [a]	NT	NT
کلروفرمی	۱۴/۴±۳/۴ [ad]	۸/۳±۰/۴ [b]	۰ [a]	NT	NT
آبی	۱/۵±۱[c]	۱ [c]	۰[a]	۲/۲±۰/۳[b]	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴[d]	۱۵/۴±۰/۵[a]	۱۹/۷±۰/۳ [b]	۲۳/۴±۱/۴[c]	۲۴/۶±۰/۸[a]

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۹: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *L. snyderiae* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V. alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۹/۶±۱/۸[a]	۸/۸±۱[a]	۸/۴±۱/۲[a]	۶/۵±۱/۵ [a]	۵±۰/۶ [a]
متانولی	۱۴/۵±۲/۸ [b]	۸±۱/۵[a]	۷/۵±۱[a]	NT	NT
کلروفرمی	۱۶/۷±۳ [c]	۹/۳±۰/۸[a]	NT	۸/۵±۲/۱ [a]	۹±۱/۹[b]
آبی	۲/۵±۱[d]	۲±۱/۱[b]	۱/۴±۱[b]	۰[b]	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴[e]	۱۵/۴±۰/۵[c]	۱۹/۷±۰/۳[c]	۲۳/۴±۱/۴[c]	۲۴/۶±۰/۸ [c]

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

جدول ۴- ۱۰: میانگین ± انحراف معیار (SD) قطر هاله مهار رشد (mm) عصاره‌های جلبک *P.borgeseni* بر باکتری‌های مختلف

عصاره	*V. harveyi*	*V. alginolyticus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aurues*
اتانولی	۰ [a]	۰[a]	۰ [a]	۹/۵±۱/۳ [a]	۴/۵±۰/۵ [a]
متانولی	۰ [a]	NT	۰ [a]	۸/۳±۲/۱ [a]	۷/۵±۱/۶ [b]
کلروفرمی	۰ [a]	۴/۳±۰/۸[b]	NT	۸±۲/۱ [a]	۷±۱/۳ [b]
آبی	NT	NT	NT	NT	NT
OTC	۱۳/۳±۰/۴ [b]	۱۵/۴±۰/۵ [c]	۱۹/۷±۰/۳[b]	۲۳/۴±۱/۴[b]	۲۴/۶±۰/۸ [c]

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

۴-۲-۲- نتایج MIC و MBC

جداول ۴-۱۱ تا ۴-۱۷ کمترین غلظت‌هایی از هر عصاره که توانایی مهار رشد (MIC) باکتری را دارامی باشد و کمترین غلظت هر عصاره که موجب کشته شدن ۹۹٪ باکتری‌ها می‌شود (MBC) را نشان می‌دهند. همان‌طور که در این جداول دیده می‌شود، کمترین غلظتی از عصاره‌ها که موجب مهار رشد باکتری‌های مورد آزمون شده است برابر ۰/۲۵ mg/ml و مربوط به عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌های *L.snyderiae* و *P.borgesseni* و روی باکتری *B. subtilis* بود. از طرفی کمترین غلظتی از عصاره‌ها که موجب مهار رشد باکتری *ویبریو هاروی* به‌عنوان باکتری پاتوژن میگوها شده است مربوط به عصاره‌های اتانولی و کلروفرمی جلبک‌های *L.snyderiae* و *G.corticata* و همچنین عصاره کلروفرمی جلبک *S.angustifolium* غلظت ۲mg/ml و بیشترین آن مربوط به عصاره اتانولی *K.alvarezii* با غلظت ۸mg/ml بود (جداول ۴-۱۱ تا ۴-۱۷).

کمترین میزان MBC از بین عصاره‌های متفاوت جلبک‌های مختلف مربوط به عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌های *S.angustifolium*، *G.corticata*، *L.snyderiae* و همچنین عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* با غلظت ۴mg/ml بود و عصاره اتانولی *K.alvarezii* با غلظت ۳۲mg/ml بود که نسبت به سایر موارد از مقدار بیشتری برخوردار بود.

جدول ۴- ۱۱: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *S.angustifolium* برای باکتری‌های مورد آزمون برحسب mg/ml

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	۴	۸	۸	۸	۲	۴
V. alginolyticus	۸	۸	۴	۸	۴	۴
E. coli	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵
B. subtilis	۱	۲	۱	۱	۰/۵	۱
S. aurues	۰/۵	۱	۲	۴	۱	۱

جدول ۴- ۱۲: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های جلبک *S.ilicifolium* برای باکتری‌های مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	–	–	–	–	–	–
V. alginolyticus	–	–	–	–	۸	۱۶
E. coli	۲	۴	NT	NT	۴	۴
B. subtilis	NT	NT	۴	۸	۲	۴
S. aurues	۴	۴	–	–	۱	۲

جدول ۴- ۱۳: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *C.iyengarii* برای باکتری‌های مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	–	–	–	–	–	–
V. alginolyticus	-	-	-	-	-	-
E. coli	۴	۸	۴	۱	۲	
B. subtilis	۱	۲	NT	NT	NT	NT
S. aurues	۲	۴	–	–	–	–

جدول ۴- ۱۴: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *K.alvarezii* برای باکتری‌های مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	۸	۳۲	۱۶	۳۲	۸	۸
V. alginolyticus	۳۲	۳۲	۸	۸	۱۶	۱۶
E. coli	–	–	–	–	۰/۵	۱
B. subtilis	۴	۴	۲	۴	۴	۸
S. aurues	NT	NT	۲	۴	۱	۱

جدول ۴- ۱۵: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *G.corticata* برای باکتری‌های مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	۲	۸	۸	۸	۲	۴
V. alginolyticus	۸	۸	۴	۸	۴	۱۶
E. coli	–	–	–	–	–	–
B. subtilis	۲	۴	NT	NT	NT	NT
S. aurues	NT	NT	NT	NT	NT	NT

جدول ۴- ۱۶: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *L.snyderiae* برای باکتری‌های مورد آزمون

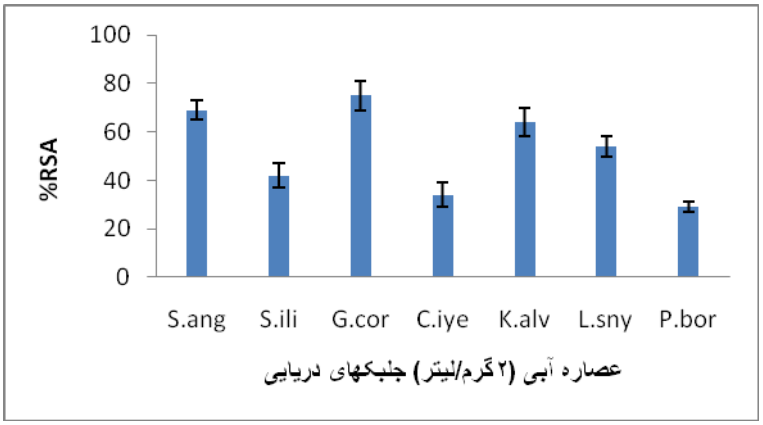
باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	۲	۴	۴	۳۲	۲	۴
V. alginolyticus	۱۶	۱۶	۸	۸	۸	۱۶
E. coli	۰/۵	۲	۱	۴	NT	NT
B. subtilis	۱	۲	NT	NT	۰/۲۵	۱
S. aurues	۰/۵		NT	NT	۲	۲

جدول ۴- ۱۷: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) جلبک *P.borgessenii* برای باکتری‌های مورد آزمون

باکتری	عصاره اتانولی		عصاره متانولی		عصاره کلروفرمی	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
V. harveyi	–	–	–	–	–	–
V. alginolyticus	–	–	NT	NT	۴	۱۶
E. coli	–	–	–	–	NT	NT
B. subtilis	۱	۲	۴	۴	۰/۲۵	۱
S. aurues	۲	۴	۸	۱۶	۴	۸

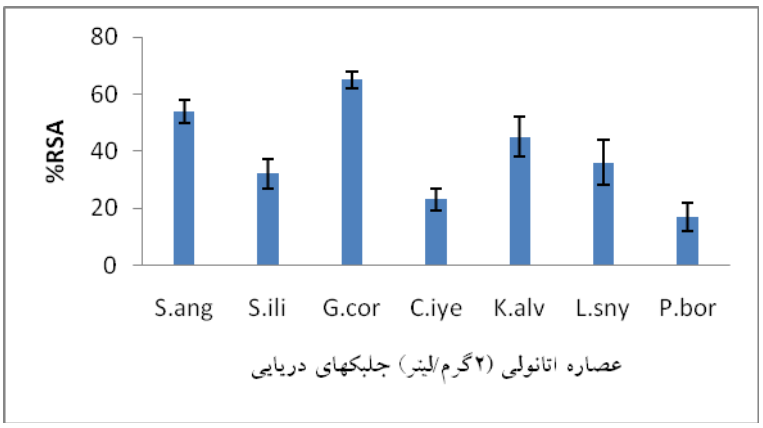
۴-۳- نتایج بررسی‌های آنتی‌اکسیدانی

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف جلبک‌های دریایی از طریق برداشت رادیکال آزاد و به روش DPPH انجام شد، نتایج فعالیت برداشت رادیکال آزاد در ۴ عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی ۷ جلبک مورد آزمون با غلظت mg/ml ۲ به‌صورت میانگین درصد کاهش میزان DPPH در نمودارهای ۴-۱ تا ۴-۴ نمایش داده‌شده است. همان‌طور که در نمودارهای ۴-۱ تا ۴-۴ دیده می‌شود، جلبک قرمز *G.corticata* با غلظت mg/ml ۲ در اکثر موارد دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی (از طریق برداشت رادیکال آزاد(DPPH بود و کمترین اثر مربوط به جلبک قهوه‌ای *P.borgesseni* بود که اختلاف بین این دو گروه دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). قدرت سایر جلبک‌ها در برداشت رادیکال آزاد بین این دو جلبک قرار داشتند که اختلاف‌ها برخی معنی‌دار و بعضی ازنظر آماری معنی‌دار نبودند (P<۰/۰۵).

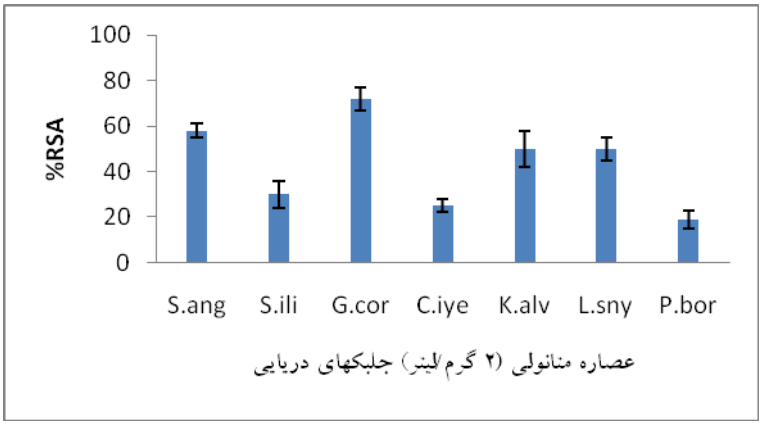


نمودار ۴- ۱: نمودار ۴-۱: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره آبی جلبک‌های مختلف به روش DPPH . بارها نشانگر اختلاف معیار است.

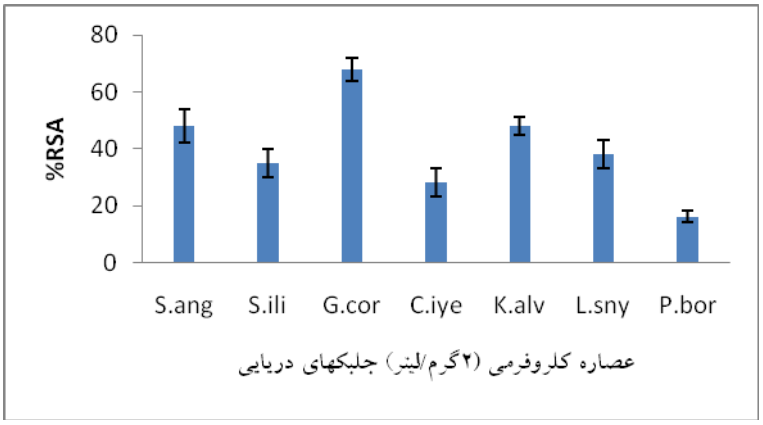
همان‌طور که در نمودارهای ۴-۱ تا ۴-۴ دیده می‌شود عصاره آبی جلبک‌ها در اکثر موارد اثرات آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشتند و بیشترین درصد برداشت رادیکال آزاد در غلظت ۲mg/ml با ۶/۴±۷۵٪ مربوط به عصاره آبی جلبک قرمز *G.corticata* بود و پس‌ازآن عصاره آبی *S.angustifolium* با ۴±۶۹٪ قرار داشت که ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۴-۱).



نمودار ۴- ۲: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره اتانولی جلبک‌های مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معیار می‌باشند.

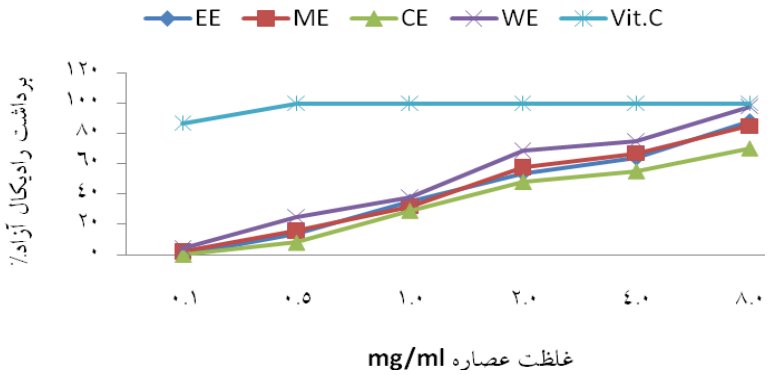


نمودار ۴- ۳: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره متانولی جلبک‌های مختلف به روش DPPH. بارها نشانگر انحراف معیار می‌باشند.



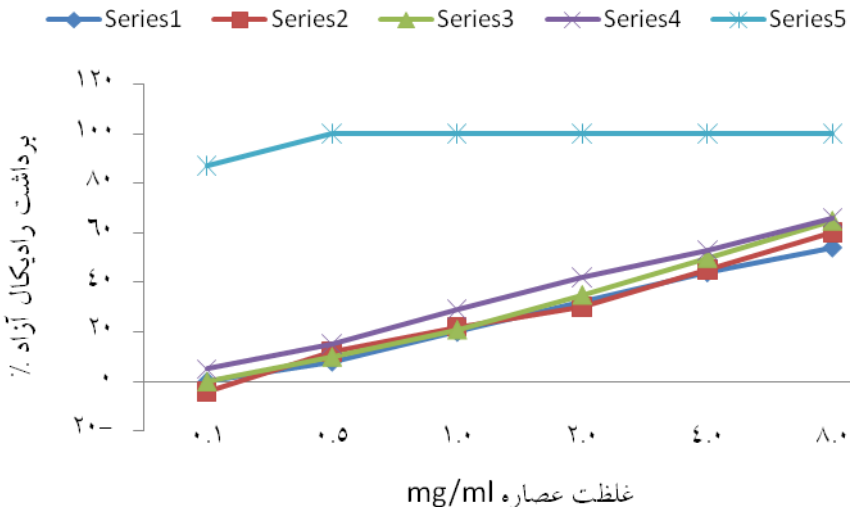
نمودار ۴- ۴: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) عصاره کلروفرمی جلبک‌های مختلف به روش DPPH. بارها میزان انحراف معیار را نشان می‌دهند.

نمودارهای ۴-۵ تا ۴-۱۱ تأثیر غلظت عصاره‌های مختلف جلبک‌ها در برداشت رادیکال آزاد DPPH و مقایسه آن با ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی و شاهد نشان می‌دهد، همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمامی موارد با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان برداشت رادیکال آزاد نیز بیشتر می‌شود.

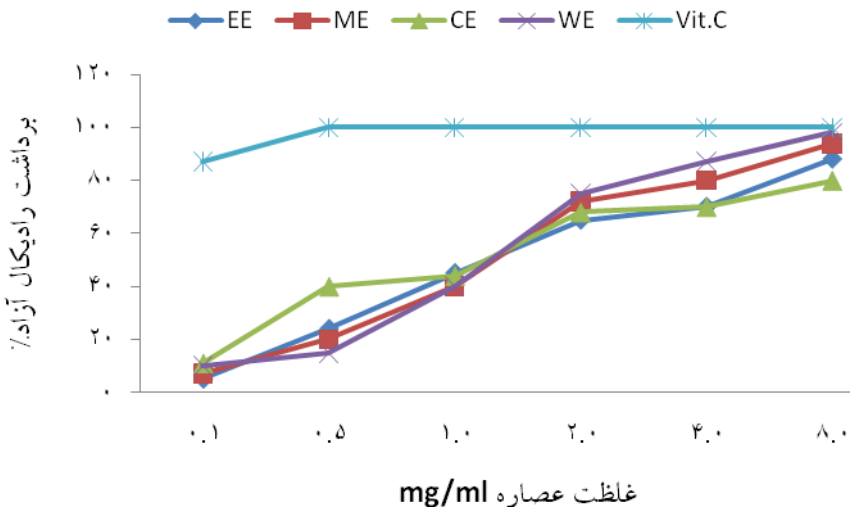


نمودار ۴- ۵: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *S.anguistifolium* با ویتامین C به روش حذف DPPH

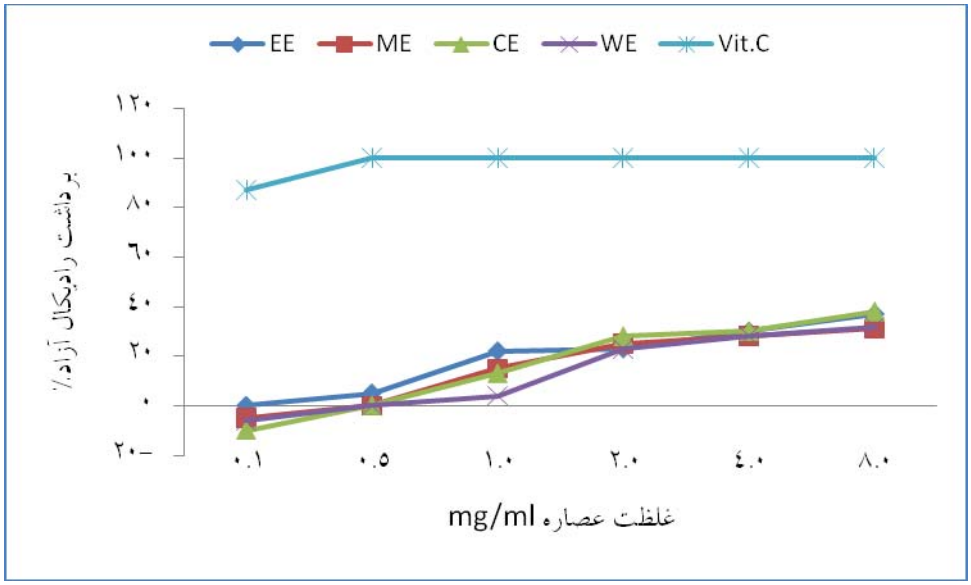
همان‌طور که در نمودارهای ۴- ۵ تا ۴-۱۱ مشاهده می‌شود، عصاره آبی همه جلبک‌ها نسبت به سایر عصاره‌ها، دارای قدرت بیشتری در برداشت رادیکال آزاد DPPH بود که این نتیجه ازنظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱)، پس‌ازآن در بیشتر موارد عصاره متانولی از قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود و سپس اتانولی یا در برخی موارد عصاره کلروفرمی قدرت برداشت رادیکال آزاد بیشتری داشت که این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵).



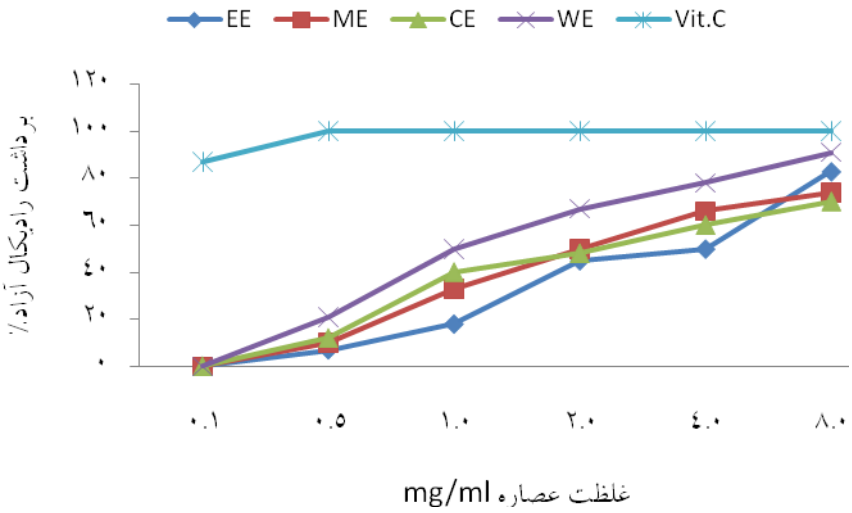
نمودار ۴- ۶: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *S.ilicifolium* با ویتامین C به روش حذف DPPH



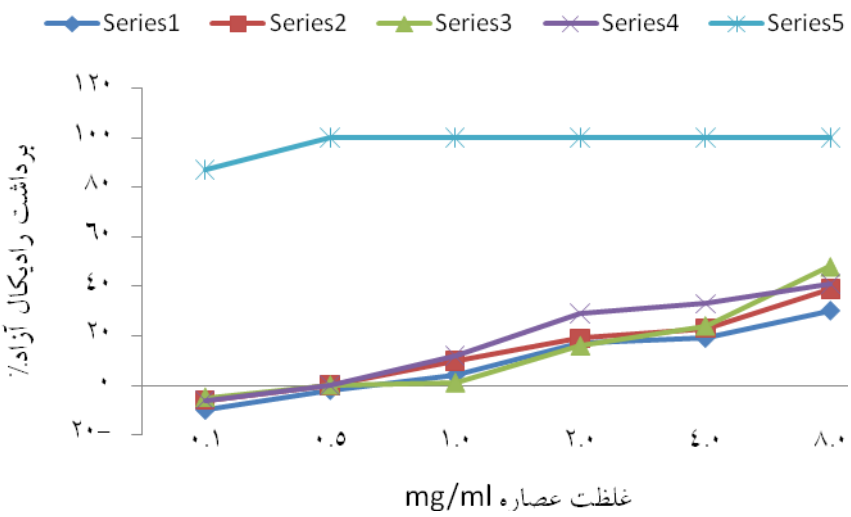
نمودار ۴- ۷: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *G.corticata* با ویتامین C به روش حذف DPPH



نمودار ۴- ۸: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *C.iyengari* با ویتامین C به روش حذف DPPH

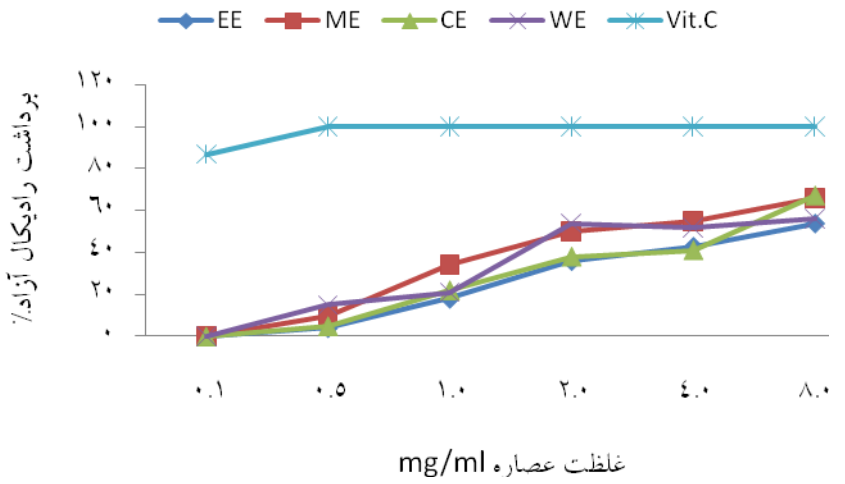


نمودار ۴- ۹: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *K.alvarezii* با ویتامین C به روش حذف DPPH



نمودار ۴- ۱۰: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، عصاره اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *P.borgesseni* با ویتامین C به روش حذف DPPH

نمودارهای ۴-۵ تا ۴-۱۱ همچنین نشان می‌دهند فعالیت آنتی‌اکسیدانی تمامی عصاره‌های جلبکی وابسته به غلظت آن‌ها هست و با افزایش غلظت توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH نیز بیشتر می‌شود.



نمودار ۴- ۱۱: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برداشت رادیکال آزاد) غلظت‌های مختلف عصاره آبی، اتانولی، متانولی و کلروفرمی جلبک *L.snyderiae* با ویتامین C به روش حذف DPPH

نتایج غلظتی از عصاره که بتواند به میزان ۵۰٪ از رادیکال آزاد برداشت کند (EC_{50}) برای عصاره‌های متفاوت از جلبک‌های مختلف محاسبه و در جدول شماره ۴-۱۸ به‌صورت میانگین و انحراف معیار نمایش داده‌شده است. نتایج نشان می‌دهند که کمترین میزانی از عصاره که قادر است حداقل ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH را از

محیط حذف کند مربوط به عصاره آبی جلبک قرمز *K. alvarezii* با میانگین mg/ml ۰/۲ ± ۱ و پس‌ازآن متعلق به عصاره آبی جلبک قرمز *G.corticata* با میانگین mg/ml ۰/۱ ± ۱/۲ و در رتبه سوم عصاره آبی جلبک قهوه‌ای S.angustifolium با میانگین mg/ml ۰/۲ ± ۱/۳ قرار داشت که این سه مورد با همدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (P<۰/۰۵) درحالی‌که نسبت به نتایج سایر جلبک‌ها دارای تفاوت معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵) (جدول ۴-۱۸). از طرفی بیشترین میانگین EC_{50} مربوط به عصاره متانولی جلبک سبز *C. iyengarii* با مقدار mg/ml ۱/۲۵± ۱۲ بود که دارای تفاوت معنی‌دار با سایر موارد بود (P<۰/۰۵). میانگین EC_{50} عصاره‌های مختلف جلبک سبز *C. iyengarii* در همه موارد نسبت به سایر جلبک‌ها بیشتر بود و به نظر می‌رسد دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به سایرین باشد. میزان EC_{50} عصاره‌های آبی همه جلبک‌ها نسبت به سایر عصاره‌های آلی هر جلبک کمتر بود و این نتیجه برای همه جلبک‌ها دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان EC_{50} اسیداسکوربیک (Vit. C) نیز ۰/۰۰۶mg/ml بود که با همه گروه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۱).

جدول ۴- ۱۸: میزان EC_{50} عصاره‌های مختلف جلبکی برای حذف رادیکال DPPH به mg/ml*

جلبک	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره کلروفرمی	عصاره آبی
S. angustifolium	۱/۸ ± ۰/۶^{ad}	۱/۷ ± ۰/۳ ^{ea}	۲ ± ۰/۴^{a}	۱/۳ ±۰/۲ ^{a}
S.ilicifolium	۵/۵ ± ۰/۴^{b}	۶ ± ۰/۳۳ ^{b}	۴/۱ ± ۰/۳^{b}	۳/۵ ±۰/۵ ^{b}
C. iyengarii	۱۱/۱ ± ۱/۳ ^{c}	۱۲ ±۱/۲۵ ^{c}	۱۱ ± ۰/۸^{c}	۱۰±۰/۵ ^{c}
K. alvarezii	½ ± ۰/۲۸ ^{a}	۲ ±۰/۴ ^{a}	۲/۲ ± ۰/۳^{a}	۱ ±۰/۲ ^{a}
G. corticata	۱/۳ ± ۰/۲ ^{d}	۱/۴ ± ۰/۳ ^{e}	۱/۴± ۰/۲۵^{d}	۱/۲ ±۰/۱ ^{a}
L. Snyderia	۷ ± ۱/۱^{b}	۲ ± ۰/۲۵ ^{a}	۶/۲ ± ۰/۸^{e}	۱/۸ ±۰/۲ ^{e}
P. borgesseni	۱۰/۵ ± ۱/۱^{c}	۹/۵ ± ۰/۶۵ ^{d}	۹ ± ۰/۵^{f}	۸/۸ ± ۰/۷ ^{d}
Vit. C	۰/ ۰۰۶^{g} mg/ml			

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

۴-۴- نتایج LC_{50} عصاره جلبک‌ها بر ناپلی آرتمیا

به‌طور میانگین عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌ها نسبت به عصاره‌های الکلی (اتانولی و متانولی) در غلظت برابر سمیت بیشتری برای ناپلی آرتمیا داشتند (جدول ۴-۱۹). بیشترین سمیت عصاره کلروفرمی جلبک *K. alvarezii* و کمترین سمیت عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* باقدرت کشندگی ۵۰٪ ناپلی آرتمیا داشتند که به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱۸ ± ۰/۴ و ۰/۲ ± ۳/۸ باعث تلفات نیمی از جمعیت ناپلی آرتمیا طی ۲۴ ساعت می‌شدند و ازنظر آماری نیز معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). سمیت عصاره‌های اتانولی و متانولی جلبک‌های مختلف برای ناپلی آرتمیا متفاوت بودند، در بین عصاره‌های اتانولی، عصاره اتانولی جلبک *S.ilicifolium* بیشترین سمیت و عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* کمترین سمیت داشتند. در بین عصاره‌های الکلی نیز بیشترین سمیت عصاره متانولی جلبک

S.ilicifolium و کمترین سمیت عصاره اتانولی جلبک *G. corticata* داشتند که ازنظر آماری با سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). با بررسی نتایج سمیت عصاره‌های مختلف (جدول ۴-۱۹) تصمیم به انتخاب عصاره اتانولی برای غنی‌سازی آرتمیا گرفته شد.

جدول ۴- ۱۹: میزان $LC_{50}24$ عصاره‌های مختلف جلبکی برای ناپلی آرتمیا برحسب mg/ml

جلبک	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	عصاره کلروفرمی
S. angustifolium	۰/۸ ± ۰/۱۳ [a]	۰/۹ ± ۰/ ۳ [a]	۰/۵ ± ۰/۲۳ [a]
S. ilicifolium	۰/۵۸ ± ۰/۲۴ [b]	۰/۶۸ ± ۰/ ۳۳ [b]	۰/۴۵ ± ۰/۳ [a]
C. iyengarii	۱/۳۲ ± ۰/۲۸ [c]	۱/۴ ±۰/۲۵ [c]	۰/۴۴ ± ۰/۱۵ [a]
K. alvarezii	۱/۲ ± ۰/۲۸ [c]	۰/۸ ±۰/۲۱ [ab]	۰/۴ ± ۰/۱۸ [a]
G. corticata	۳/۸ ± ۰/۲ [d]	۲/۳ ± ۰/۳۲ [d]	۱/۱± ۰/۲۵ [c]
L. Snyderia	۱/۴۷ ± ۰/۲۴ [c]	۱ ± ۰/۲۵ [ac]	۰/۷۳ ± ۰/۲۳ [b]
P. borgesseni	۱/۵ ± ۱/۱ [c]	۰/۸۷ ± ۰/۱۵ [ab]	۰/۷ ± ۰/۵ [b]

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

۵-۴- نتایج بار آلودگی

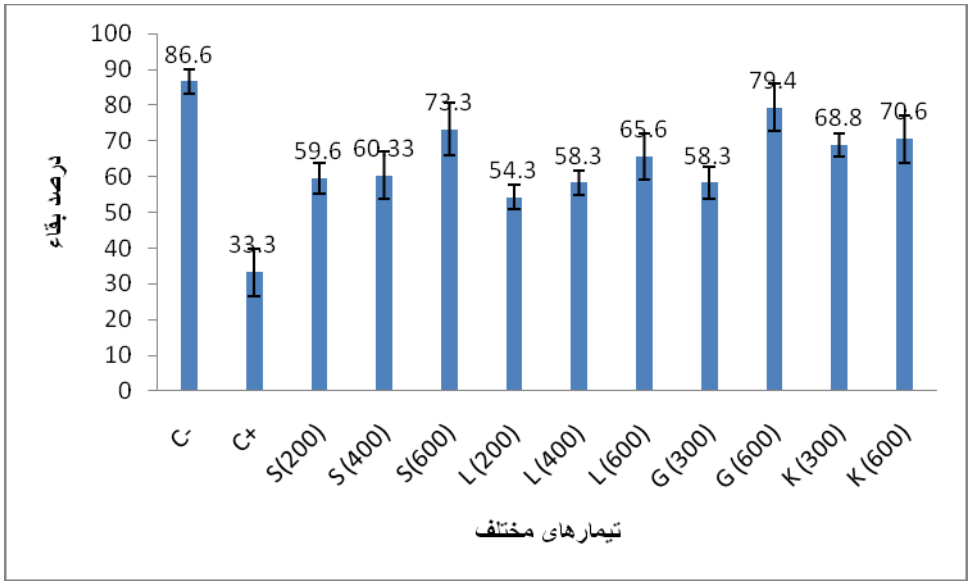
میزان بار آلودگی ویبریویی در بافت هموژن شده بچه میگوی سفید غربی در گروه کنترل منفی (بدون عصاره جلبک و بدون قرار گرفتن در معرض باکتری) در روز دهم پرورش $۰/۲ \pm ۰/۰۲\times۱۰^{۳}$ CFU/g Tissue بود که در روزهای بیستم و سی‌ام پرورش باکمی افزایش به ترتیب به $۰/۴ \pm ۰/۰۲\times۱۰^{۳}$ CFU/g Tissue و $۰/۵ \pm ۰/۰۳\times۱۰^{۳}$ CFU/g Tissue رسید، این نتیجه نشان می‌دهد که باکتری‌های *Vibrio spp.* به‌طور طبیعی در محیط پرورش میگوها (آب دریا) وجود دارد. بار آلودگی باکتریایی (*Vibrio spp.*) در گروه کنترل مثبت (بدون عصاره جلبک و با قرار گرفتن در معرض باکتری) در هر ۳ موقع نمونه‌گیری از همه گروه‌ها بیشتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که همه عصاره‌ها توانسته‌اند میزان بار آلودگی باکتریایی در محیط را کاهش دهند. در گروه‌های تیمار معمولا با افزایش غلظت عصاره جلبک‌ها بار آلودگی باکتریایی کمتر شده است، هرچند این مطلب در همه موارد صدق نمی‌کند (جدول ۴-۲۰). در بین گروه‌های تیمار غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره *لورنسیا اسنیدریا* توانسته بود بیشترین کاهش در بار باکتریایی ایجاد کند ($۰/۶ \pm ۰/۰۳\times۱۰^{۴}$ CFU/g Tissue) درحالی‌که غلظت پایین همین عصاره کمترین قدرت در کاهش بار آلودگی باکتریایی داشت ($۰/۵ \pm ۰/۰۱\times۱۰^{۵}$ CFU/g Tissue). میزان کاهش بار آلودگی باکتریایی توسط عصاره‌های اتانولی سایر جلبک‌ها در محدوده بین این دو عدد قرار گرفت که این نتایج در جدول ۴-۲۰ به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه‌شده است. همان‌طور که در جدول مذکور مشاهده می‌شود میزان بار آلودگی با افزایش روزهای پرورش تقریبا در تمام گروه‌ها افزایش پیداکرده است.

جدول ۴- ۲۰: بار باکتریایی برحسب $CFU\ g^{-1}$ (± انحراف معیار) در بافت هموژن شده بچه میگوهای پرورش‌یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری *V.harveyi* در فازهای مختلف دوره آزمایش.

گروه	روز ۱۰	روز ۲۰	روز ۳۰
C-	۰/۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۳}	۰/۴±۰/۰۲×۱۰^{۳}	۰/۵ ±۰/۰۳×۱۰^{۳}
C+	۳/۲ ±۰/۰۶×۱۰^{۵}	۲/۸ ±۰/۰۷×۱۰^{۵}	۳/۴ ±۰/۰۵×۱۰^{۵}
S(۲۰۰)	۱/۲ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۱/۵ ±۰/۰۷×۱۰^{۴}	۲/۱ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}
S(۴۰۰)	۱/۴ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۱/۶ ±۰/۰۴×۱۰^{۴}	۱/۷ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}
S(۶۰۰)	۱/۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}	۱/۵ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۱/۴ ±۰/۰۷×۱۰^{۴}
L(۲۰۰)	۰/۵ ±۰/۰۱×۱۰^{۵}	۱/۴ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۳/۲ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}
L(۴۰۰)	۱/۵ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۲/۳ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۲/۵ ±۰/۰۴×۱۰^{۴}
L(۶۰۰)	۰/۶ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۰/۹ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۲/۱ ±۰/۰۶×۱۰^{۴}
G(۳۰۰)	۱/۳ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}	۱/۸ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۱/۶ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}
G(۶۰۰)	۰/۷ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}	۱/۱ ±۰/۰۴×۱۰^{۴}	۱/۵ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}
K(۳۰۰)	۱/۶ ±۰/۰۲×۱۰^{۴}	۱/۴ ±۰/۰۴×۱۰^{۴}	۱/۸ ±۰/۰۷×۱۰^{۴}
K(۶۰۰)	۰/۳ ±۰/۰۱×۱۰^{۵}	۱/۱ ±۰/۰۳×۱۰^{۴}	۱/۹ ±۰/۰۵×۱۰^{۴}

۶-۴-نتایج رشد و بازماندگی

بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) تغذیه‌شده با آرتمیای غنی‌سازی نشده و پرورش‌یافته در محیط فاقد باکتری (C-) پس از ۳۰ روز پرورش دارای بیشترین درصد بقاء بودند (۴/۳ ± ۸۶.۶٪) که با سایر گروه‌ها به‌جز گروه (۶۰۰) G (آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر گراسیلاریا) دارای تفاوت معنی‌دار بود (P< ۰/۰۱)؛ اما میگوهایی که از آرتمیای غنی‌سازی نشده استفاده کرده بودند و در محیط دارای باکتری *V.harveyi* قرارگرفته بودند (C+)، پس از ۳۰ روز پرورش دارای کمترین درصد بقاء بودند (۶/۶ ± ۳۳/۳٪) که این تفاوت با تمام گروه‌ها ازنظر آماری معنی‌دار بود (P< ۰/۰۱). میگوهای پرورش‌یافته در آب دریای واجد باکتری *V.harveyi* و تغذیه‌شده با آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های جلبک‌های مورد آزمون (*S. angustifolium*، *L. Snyderia*، *G. corticata* و *K. alvarezii*) همگی دارای درصد بقاء کمتر از کنترل منفی و بیشتر از کنترل مثبت بودند (نمودار ۱۲-۴) که اختلاف‌های آن‌ها در برخی موارد معنی‌دار و بعضی غیر معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵)، اما غلظت‌های بالاتر هر جلبک در تمامی موارد از غلظت‌های کمتر باعث افزایش بقاء بچه میگوها شده بود هرچند اختلاف‌ها به‌جز در مورد جلبک گراسیلاریا معنی‌دار نبود (P< ۰/۰۵).



نمودار ۴- ۱۲: درصد بقاء بچه میگوهای سفید غربی تغذیه‌شده با آرتمیای غنی نشده و غنی‌شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی جلبک‌های مورد آزمون، پرورش‌یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری *V.harveyi* پس از ۳۰ روز دوره پرورشی. بارها نشانگر انحراف معیار هستند.

بیشترین مقدار وزن کسب‌شده در بچه میگوهایی دیده شد که علاوه بر غذای پایه از آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی *گراسیلاریا کورتیکاتا* نیز استفاده کرده بودند که این تفاوت با همه گروه‌ها به‌جز گروه کنترل منفی (C-) که با آرتمیای غنی‌سازی نشده تغذیه‌شده بودند و در معرض باکتری *V.harveyi* قرار نگرفته بودند، معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). کمترین وزن کسب‌شده نیز در بچه میگوهایی به دست آمد که علاوه بر غذای پایه از آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره اتانولی جلبک *لورنسیا اسنیدریا* استفاده کرده بودند پس‌ازآن گروه کنترل مثبت یعنی بچه میگوهایی که فقط از غذای پایه به‌علاوه آرتمیای غنی نشده استفاده کرده بودند و در معرض باکتری قرارگرفته بودند (C+) کمترین وزن طی ۳۰ روز دوران پرورش به دست آوردند که این اختلاف بین دو گروه غیر معنی‌دار و با سایر گروه‌ها معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). عملکرد سایر عصاره‌ها بر روی پارامترهای رشد در جدول ۴-۲۱ آورده شده است.

جدول ۴- ۲۱: طول و وزن اولیه، طول و وزن نهایی، وزن کسب‌شده و درصد نرخ رشد ویژه (SGR) در بچه میگوهای سفید غربی تغذیه‌شده با آرتمیای غنی نشده و غنی‌شده با عصاره اتانولی جلبک‌های مختلف، پرورش‌یافته در محیط فاقد یا واجد باکتری ویبریو هاروی

گروه	طول اولیه (cm)	وزن اولیه (mg)	طول نهایی (cm)	وزن نهایی (mg)	وزن کسب کرده (mg)	SGR%
کنترل منفی	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۴۵ ±۰/۶۲^{a}	۱۸۶ ± ۴/۵ ^{a}	۱۷۹/۸ ±۲/۸ ^{a}	۱۱/۳ ±۰/۳۷ ^{a}
کنترل مثبت	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۳۸ ±۰/۵۴^{b}	۱۲۱ ±۶/۴ ^{b}	۱۱۳/۸ ±۴/۳ ^{b}	۹/۹۰ ±۰/۲۴ ^{b}
سارگاسوم (۲۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۸۸ ±۰/۲ ^{ab}	۱۶۶ ± ۳/۸ ^{c}	۱۵۹/۴ ±۳/۱ ^{c}	۱۰/۹ ±۰/۳۴ ^{c}
سارگاسوم (۴۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۹۸ ±۰/۴ ^{ab}	۱۷۳ ± ۵/۳^{c}	۱۶۶/۸ ±۳/۹ ^{d}	۱۱/۱ ±۰/۲۲ ^{c}
سارگاسوم (۶۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۷۵ ±۰/۵۷^{b}	۱۵۳ ± ۴/۲ ^{d}	۱۴۶/۵ ±۲/۷ ^{e}	۱۰/۶۸ ±۰/۳ ^{d}
لورنسیا (۲۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۲/۳۵ ±۰/۳۴^{b}	۱۱۵ ± ۳/۵^{b}	۱۰۸/۸ ±۳/۳ ^{b}	۹/۷۳ ±۰/۳۶^{b}
لورنسیا (۴۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۳۴ ±۰/۴^{a}	۱۸۱ ± ۴/۶ ^{a}	۱۷۴/۸ ±۴/۷ ^{a}	۱۱/۲۶ ±۰/۳ ^{c}
لورنسیا (۶۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۵۵ ±۰/۲۴^{a}	۱۷۳ ± ۵/۲ ^{c}	۱۶۲/۸ ±۵/۱ ^{c}	۱۱/۱ ±۰/۵ ^{c}
گراسیلاریا (۳۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۸۲ ±۰/۵۵^{ac}	۱۹۵ ± ۵/۸ ^{e}	۱۸۴/۸ ±۳/۹ ^{g}	۱۱/۵ ±۰/۴ ^{a}
گراسیلاریا (۶۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۸۰ ±۰/۳۲^{ac}	۱۹۰ ± ۳/۷ ^{e}	۱۷۸/۶ ±۴/۷^{g}	۱۱/۴ ±۰/۳۱ ^{a}
کاپافیکوس (۳۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/ ۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۱۵ ±۰/۳ ^{ac}	۱۵۳ ± ۴/۹ ^{d}	۱۴۶/۸ ±۴/۵ ^{e}	۱۰/۷ ±۰/۲۳ ^{d}
کاپافیکوس (۶۰۰mg/l)	۱/۰۶ ±۰/۲۴^{a}	۶/۲ ±۰/۸۸ ^{a}	۳/۹۲ ±۰/۴۳^{a}	۱۴۵ ± ۳/۸^{d}	۱۳۸/۸ ±۳/۷ ^{e}	۱۰/۵ ±۰/۱۵ ^{d}

*حروف لاتین غیر همنام در هر ستون نشانه معنی‌دار بودن آماری نتیجه است.

همان‌طور که در جدول ۴-۲۱ دیده می‌شود در مورد *گراسیلاریا کورتیکاتا* با افزایش غلظت عصاره به دو برابر در میزان وزن کسب‌شده و همچنین نرخ ویژه رشد تغییری حاصل نشده است درحالی‌که در سایر موارد هر موقع غلظت عصاره‌ها از حدی بیشتر شده است (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش میزان رشد بچه میگوها شده است (جدول ۴-۲۰). رشد کسب شده در گروه کنترل مثبت نسبت به اکثر گروه‌های آزمایش به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P< ۰/۰۵). نرخ رشد ویژه بچه میگوهای سفید غربی (*L.vannamei*) پرورش‌یافته نیز تابع میزان وزن کسب‌شده بود که به‌طور معنی‌داری عصاره‌های جلبک گراسیلاریا و گروه کنترل منفی که در محیط فاقد باکتری رشد کرده بودند پس از ۳۰ روز پرورش از همه گروه‌ها بیشتر بود (P< ۰/۰۵). از طرفی بچه میگوهای تغذیه‌شده با آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم جلبک لورنسیا و آرتمیای غنی‌نشده و پرورش‌یافته در محیط دارای باکتری (کنترل مثبت) دارای کمترین میزان نرخ رشد ویژه پس از ۳۰ روز دوره آزمایش بودند که این دو گروه فاقد تفاوت معنی‌دار باهم و با سایر گروه‌ها دارای تفاوت معنی‌دار آماری بودند (P< ۰/۰۵).

۴-۷- نتایج LD_{50} *ویبریو هاروی* برای بچه میگوها

دز کشنده باکتری ویبریو هاروی برای نیمی از جمعیت بچه میگوها در آزمون چالش، برابر با ۳×۱۰^{۸} کلنی در میلی‌لیتر محاسبه شد.

۸-۴- نتایج آزمون‌های چالش با باکتری *V.harveyi*

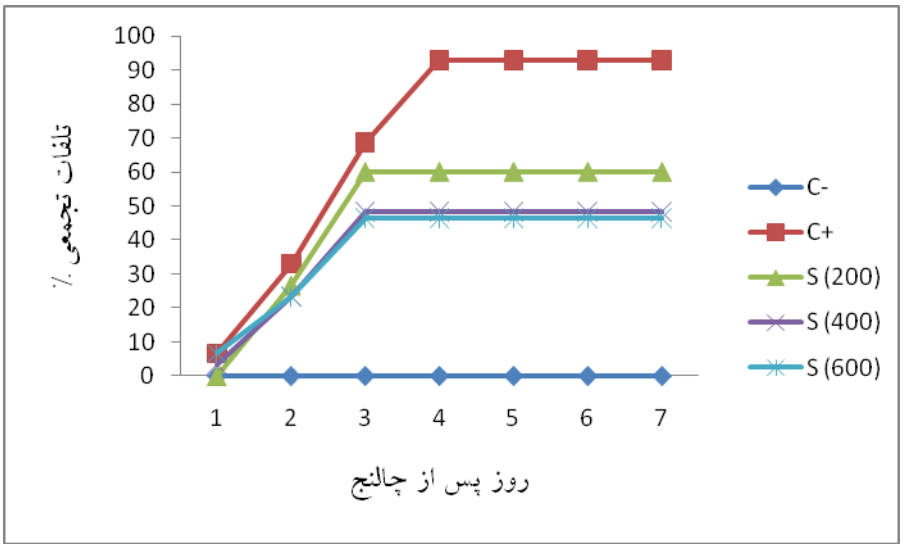
تلفات تجمعی میگوهای تیمار و شاهد در جدول ۴-۲۲ نشان داده‌شده است. همان‌طور که دیده می‌شود گروه کنترل منفی که با باکتری چالش داده نشده بود هیچ تلفاتی نداشت. در مقابل گروه کنترل مثبت که بدون درمان در معرض باکتری قرارگرفته بود دارای بیشترین میزان تلفات بود (۹۲/۸۵٪). همه میگوهایی که با دزهای مختلف عصاره اتانولی جلبک‌های دریایی انتخاب‌شده تغذیه‌شده بودند در مواجهه با باکتری *V.harveyi* درصد تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند. کمترین میزان تلفات در گروه‌هایی که در معرض باکتری قرارگرفته بودند، مربوط به گروه (۶۰۰) G با ۲۷/۵ درصد بود. میزان تلفات در سایر گروه‌ها مابین این اعداد قرار داشتند (جدول ۴-۲۲). این نتایج نشان می‌دهد که میزان تلفات در گروه‌هایی که از دزهای بالاتر عصاره‌های مختلف استفاده کرده‌اند در مواجه با باکتری پاتوژن، کمتر بوده است. همچنین درصد محافظت‌کنندگی نسبی که فاکتور مهم‌تری است در تمام مواردی که دز عصاره یک جلبک بیشتر شده است، افزایش پیداکرده هرچند که افزایش نسبی وابسته به دز در تمام موارد یکسان نیست (جدول ۴- ۲۲ و نمودار ۴-۱۷).

جدول ۴- ۲۲: تلفات تجمعی و درصد محافظت‌کنندگی عصاره اتانولی جلبک‌های مختلف و گروه‌های شاهد در مواجهه با باکتری *ویبریو هاروی*

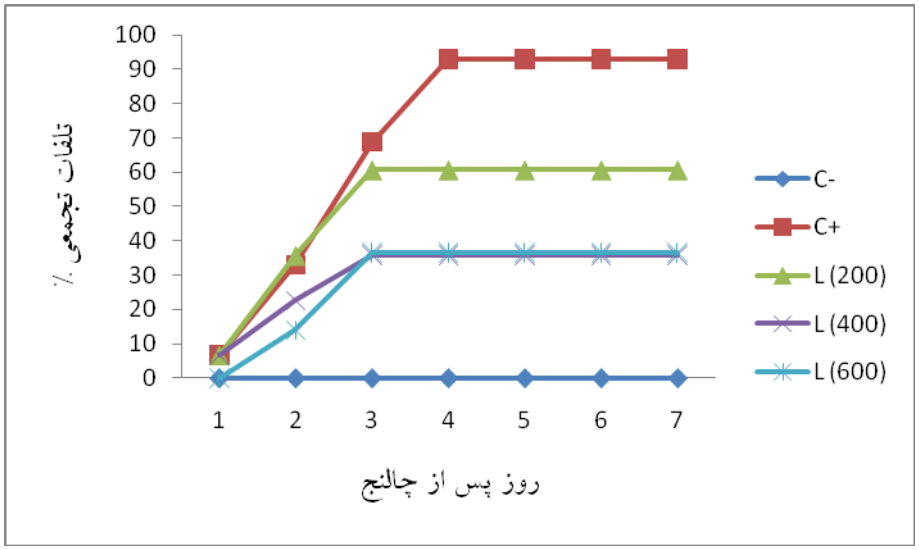
گروه	تعداد بچه میگو (عدد)	تلفات روز اول (عدد)	تلفات تجمعی پس از ۷ روز (عدد)	تلفات٪	%PRP
C+	۳۰	۲	۲۷	۹۲/۸۵	-
C-	۳۰	۲	۲	-	-
S(۲۰۰)	۳۰	۰	۱۸	۶۰	۳۵/۳۷
S(۴۰۰)	۳۰	۱	۱۵	۴۸/۲۷	۴۸
S(۶۰۰)	۳۰	۲	۱۵	۴۶/۴۲	۵۰
L(۲۰۰)	۳۰	۲	۱۹	۶۰/۷	۳۴/۶
L(۴۰۰)	۳۰	۲	۱۲	۳۵/۷	۶۱/۵
L(۶۰۰)	۳۰	۰	۱۱	۳۶/۶	۶۰/۵
G(۳۰۰)	۳۰	۰	۹	۳۰	۶۷/۶
G(۶۰۰)	۳۰	۱	۹	۲۷/۵	۷۰/۳۸
K(۳۰۰)	۳۰	۰	۱۵	۵۰	۴۶/۱۴
K (۶۰۰)	۳۰	۱	۱۱	۳۴/۴۸	۶۲/۸۶

نمودارهای ۴-۱۲ تا ۴-۱۵ تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی -C و کنترل مثبت +C) یا غذای پایه به‌اضافه آرتمیای غنی‌سازی شده با غلظت‌های مختلف جلبک‌های مورد آزمون به‌صورت واضح و طی یک هفته نشان می‌دهند. همان‌طور که

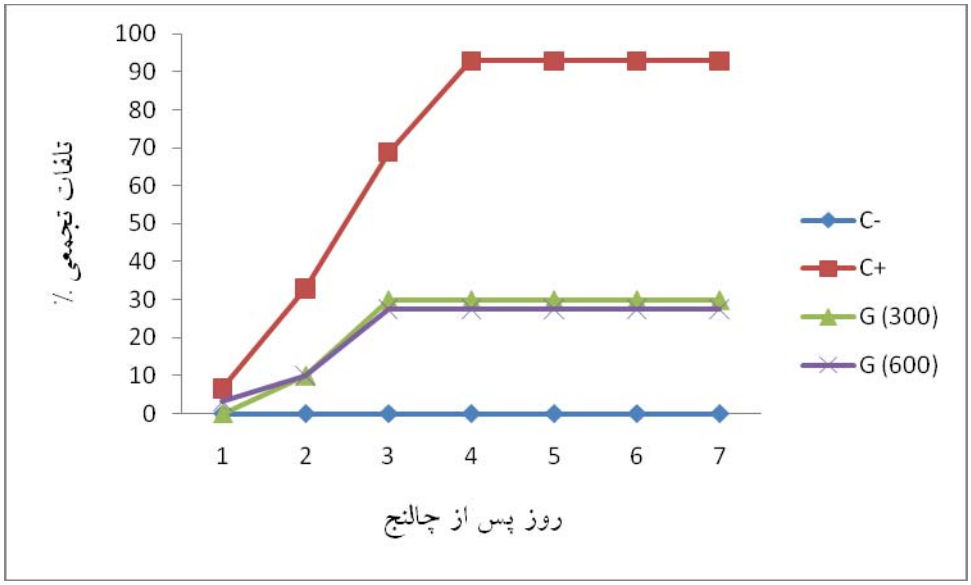
مشاهده می‌شود کلیه عصاره‌های جلبکی موجب کاهش تلفات در برابر دز کشنده باکتری *ویبریو هاروی* شده‌اند.



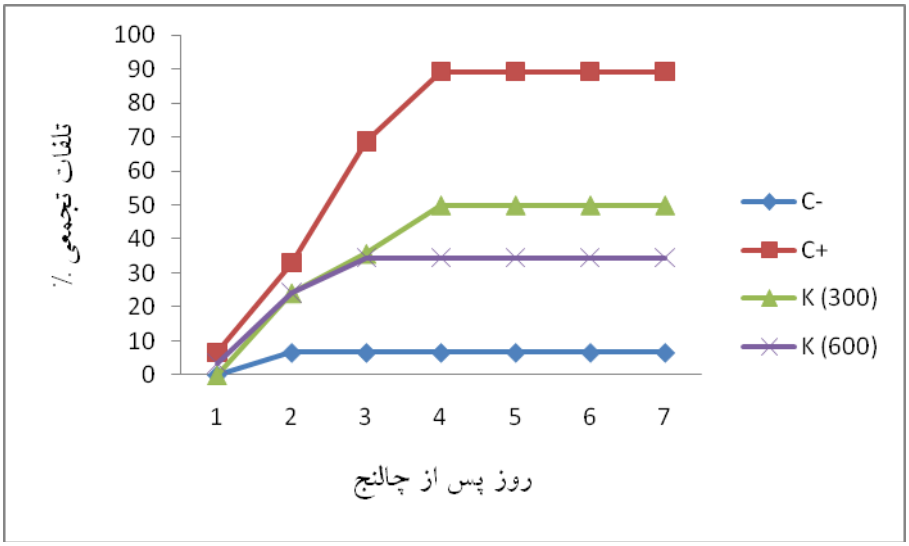
نمودار ۴- ۱۲: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی -C و کنترل مثبت +C) یا غذای پایه به‌اضافه آرتمیای غنی‌سازی شده به‌وسیله عصاره اتانولی جلبک *S.angustifolium* با دزهای مختلف (۶۰۰، ۴۰۰ و ۲۰۰ mg/l)



نمودار ۴- ۱۳: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی -C و کنترل مثبت +C) یا غذای پایه به‌اضافه آرتمیای غنی‌سازی شده به‌وسیله عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* با دزهای مختلف (۶۰۰، ۴۰۰ و ۲۰۰ mg/l)



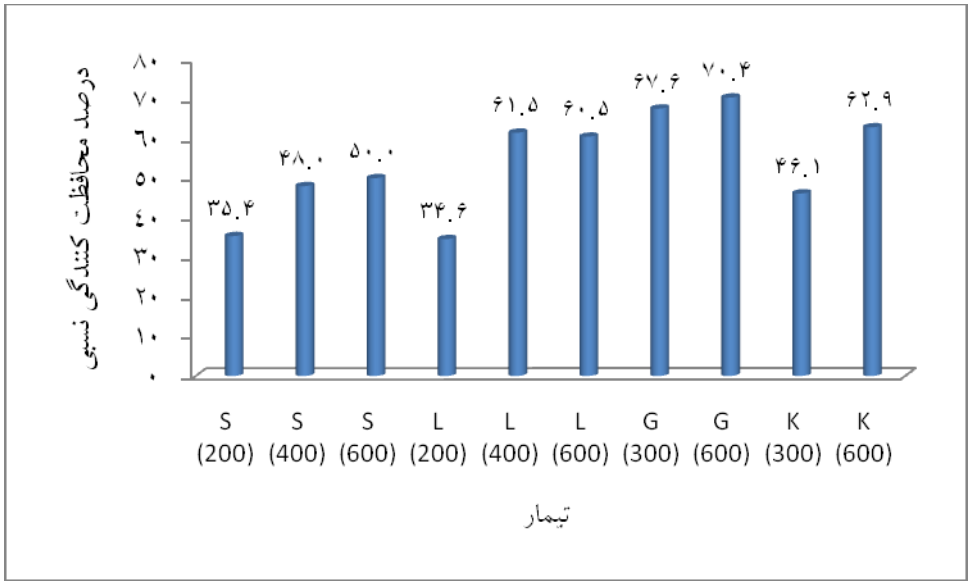
نمودار ۴- ۱۴: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی -C و کنترل مثبت +C) یا غذای پایه به‌اضافه آرتمیای غنی‌سازی شده به‌وسیله عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* با دزهای مختلف (۶۰۰ و ۳۰۰ mg/l)



نمودار ۴-۱۵: تلفات تجمعی بچه میگوهای *L.vannamei* چالنج شده با باکتری *V.harveyi* پس از تغذیه با غذای پایه (کنترل منفی -C و کنترل مثبت +C) یا غذای پایه به‌اضافه آرتمیای غنی‌سازی شده به‌وسیله عصاره اتانولی جلبک *K.alvarezii* با دزهای مختلف (۶۰۰ و ۳۰۰ mg/l)

نمودار ۴-۱۶ درصد محافظت‌کنندگی عصاره‌های اتانولی جلبک‌های انتخاب‌شده با غلظت‌های مختلف در برابر باکتری پاتوژن میگو (*V.harveyi*) را نشان می‌دهد، همان‌طور که مشاهده می‌شود دز ۶۰۰mg/l جلبک قرمز *گراسیلاریا کورتیکاتا* با ۷۰/۳۸ درصد بیشترین قدرت محافظت‌کنندگی بچه میگوها در برابر باکتری مذکور داشت و پس‌ازآن دز ۳۰۰mg/l همین جلبک و دز ۶۰۰mg/l عصاره اتانولی جلبک *K. alvarezii* با میزان

محافظت‌کنندگی به ترتیب ۶۷/۵ و ۶۲/۸۶ درصد قرار داشتند و کمترین میزان محافظت‌کنندگی مربوط به دز پایین *L. snyderiae* با ۳۴/۶٪ و دز پایین جلبک *S. angustifolium* با ۳۵/۳۷٪ بود.



نمودار ۴- ۱۶: درصد محافظت‌کنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی جلبک‌های مورد آزمون در برابر باکتری *V. harveyi*

۵-بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱- فعالیت ضدباکتریایی

محیطهای اقیانوسی و دریایی یک پتانسیل بسیار مهم به منظور کشف ترکیباتی هستند که قادرند علیه بسیاری از انگلها و بیماریهای عفونی موثر باشند (Devienne و همکاران، ۲۰۰۲). در این مطالعه عصاره های خام اتانولی، متانولی، کلروفرمی و آبی ۷ جلبک دریایی مختلف جداسازی شده از آبها و سواحل خلیج فارس به منظور فعالیت ضدباکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه تقریبا همه جلبکهای مورد آزمون اثرات ضدباکتریایی از خود نشان دادند و حداقل رشد تعدادی از باکتریهای مورد آزمایش را مهار کردند. از میان ۲۸ عصاره بدست آمده عصاره اتانولی جلبک های قرمز *G.corticata* و *L. snyderiae* بیشترین اثر مهار کنندگی بر پاتوژن میگو *V.harveyi* داشتند حتی این میزان بازدارندگی از آنتی بیوتیک استاندارد اکسی تتراسایکلین نیز بیشتر بود. به نظر می رسد جلبکهای قرمز نسبت به جلبکهای قهوه ای و سبز اثرات ضدباکتریایی قوی تری داشته باشند. در مطالعات مشابه در پژوهشی که روی فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی بیوتیکی سه گونه از جلبکهای کانال سوئز انجام شد، جلبک قرمز *L.papilosa* بیشترین اثرات ضد باکتریایی نسبت به سایر جلبکها نشان داد (Shanab، ۲۰۰۷). در تحقیق دیگری که روی ۸۲ گونه از جلبکهای پرسلولی سواحل مدیترانه ای اسپانیا انجام شده است، مشخص شد جلبک های قرمز نسبت جلبکها های قهوه ای و سبز دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی بودند (Salvador و همکاران، ۲۰۰۷). در پروژه بزرگ تحقیقاتی که روی ۱۵۱ گونه از جلبکهای دریایی سواحل انگلستان انجام شد نیز تعیین گردید که تمامی جلبکهای قرمز مورد آزمون دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه بر باکتریهای تست شده داشتند (Hornsey و Hide، ۱۹۷۴). همچنین در مطالعه دیگری نیز دیده شده جلبک قرمز *L.Snyderiae* نمونه برداری شده از سواحل استان بوشهر نسبت به جلبک قهوه ای *S.angustifolium* اثرات ضدباکتریایی بیشتری دارد (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰). در تحقیقی فعالیت ضدباکتریایی ۵ عصاره اتانولی، متانولی، استونی، کلروفرمی و اتیل استات از دو جلبک دریایی قرمز *K.alvarezii* و جلبک سبز *U.lactuta* بر روی تعدادی از باکتریهای پاتوژن انسانی مورد بررسی قرار گرفت، فعالیت ضدباکتریایی جلبک قرمز *K.alvarezii* بسیار زیاد و قابل مقایسه با جلبک *U.lactuta* نبود، همچنین در این مطالعه بیشترین فعالیت مربوط به عصاره متانولی و کمترین فعالیت مربوط به عصاره بدست آمده از حلال اتیل استات بود (Pushparaj و همکاران، ۲۰۱۴). در حالیکه به نظر می رسد، در مطالعه حاضر بیشترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط عصاره کلروفرمی باشد. به هر حال بسیاری از جلبکهای دریایی در سواحل جهان جهت اثرات ضدباکتریایی مورد آزمون قرار گرفته اند که در تعداد زیادی از آنها مشخص شده جلبکهای قرمز دارای اثرات ضدباکتریایی بیشتری نسبت به سایر جلبکها می باشند (Rao و Parekh، ۱۹۸۱؛ Reichelt و Borowitzka، ۱۹۸۴). هر چند در برخی مطالعات دیگر نیز نتایج متضادی بدست آمده است برای مثال در یک مطالعه که عصاره های متانولی ۸ جلبک دریایی مختلف از سواحل هندوستان مورد بررسی قرار گرفته است، مشاهده شد جلبک سبز *Cladophra glomerata* دارای

بیشترین اثر مهار کنندگی نسبت به جلبکهای قهو های و قرمز بر باکتریهای پاتوژن ماهی می باشد (Yuvaraj و همکاران، ۲۰۱۱). یا اینکه در تحقیق دیگری بیان شده بود از میان جلبکهای مختلف جلبک سبز *Ulva lactuta* دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی علیه باکتری *S.aureus* بود (Kandhasamy و Arrunchalam، ۲۰۰۸). در هر صورت در این مطالعه مشخص شد جلبکهای قرمز دارای اثرات ضدباکتریایی قویتری نسبت به جلبکهای سبز و قهوه ای هستند. از طرفی به نظر می رسد جلبکها دارای اثرات شدیدتری بر باکتریهای گرم مثبت نسبت باکتریهای گرم منفی باشند به طوریکه در این مطالعه حداقل یک عصاره از هر جلبک بر باکتریهای گرم مثبت آزمون شده اثرات ضدباکتریایی داشتند. این مورد در گزارشات دیگری نیز دیده شده است (Taskin و همکاران، ۲۰۰۱؛ Tuney و همکاران، ۲۰۰۶). این اثر بیشتر بر باکتریهای گرم مثبت ممکن است به خاطر وجود دیواره سلولی پیچیده در باکتریهای گرم منفی و عدم وجود این دیواره سلولی در گرم مثبتها باشد (Pesando و Caram، ۱۹۸۴؛ Valchos و همکاران، ۱۹۹۷). علاوه بر این وجود مقاومت باکتریها در برابر عصاره های جلبکی ممکن است به دلیل حضور برخی ترکیبات یا فاکتورهای مهار کننده در عصاره ها باشد (Sastry و Rao، ۱۹۹۴).

در این پژوهش کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری شده بود (MIC) ۰/۲۵mg/ml که مربوط به جلبک قرمز *L.snyderiae* و *P. borgesseni* و بر روی باکتری *B.subtilis* و بیشترین آن ۳۲mg/ml در مورد عصاره اتانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* و بر روی باکتری *V.alginolyticus* بدست آمد. در مطالعات قبلی گزارش شده که غلظت ۰/۷۵µg/ml عصاره متانولی جلبک سبز *C.glomerata* باعث مهار رشد باکتریهای *B.cereus* و *S.aureus* شده است (Yuvaraj و همکاران، ۲۰۱۱). در مورد جلبک قرمز *L.snyderia* نمونه گیری شده از سواحل شهر بوشهر نیز کمترین غلظتی که باعث مهار رشد یک باکتری شده بود ۳/۷۵ mg/ml در مورد باکتری *S.typhi* بود و بیشترین غلظت مربوط به مهار باکتری *S.salivaris* با ۱۵mg/ml بود درخشش و همکاران، ۱۳۹۰. در تحقیق دیگری حداقل غلظت بازدارنده رشد جلبک سبز *U. lactuta* برای باکتری *S.aureus* برابر ۲۰۰ µg/ml ذکر شده است (Kandhasamy و Arrunchalam، ۲۰۰۸). در پژوهش دیگری میزان MIC جلبک *S.latifolium* برای *ویبریو هاروی* جداسازی شده از میگوهای تلف شده در مراکز تکثیر استان بوشهر ۱۰mg/ml محاسبه شده بود (Dashtiannasab و همکاران، ۲۰۱۲). گزارشهای متفاوت و گاه متضادی در اثرات ضدباکتریایی جلبکهای یکسان حتی بر روی باکتریهای متفاوت و یا یکسان دیده می شود که وابسته به اختلاف فصل نمونه گیری جلبکها، روش عصاره گیری، حلالهای ارگانیک مورد استفاده و روشهای ارزیابی می باشد. مواد فعال زیستی فراوانی در جلبکهای دریایی وجود دارند که می توانند باعث اثرات ضد میکروبی جلبکها باشند، از مهمترین ترکیبات جلبکهای دریایی که دارای خواص ضد باکتریایی می باشند می توان به آلژیناتها اشاره کرد که جزء پلی ساکاریدهای گیاهان دریایی محسوب شده و در گیاهان خشکی وجود ندارند، آنها در جلبکهای قهوه ای تا ۴۷٪ وزن خشک می توانند وجود داشته باشند، اما بیشترین حضور در جلبکهای قرمز دارند (Holdt و Kraan، ۲۰۱۱). آلژیناتها می توانند به اشکال اسیدی و نمکی یافت شوند، شکل اسیدی آن به اسم اسید آلژینیک شناخته می شود که علاوه بر

خواص سخت کنندگی، قوام دهندگی، نگهدارندگی (خواص عمومی کلوییدها)، دارای خواص قوی ضدباکتریایی و ضد التهابی نیز هستند (Andriamanantoanina و همکاران، ۲۰۱۰).

از ترکیبات دیگری که خاصیت ضدباکتریایی دارند برخی از پروتئینهای مهمی است که فعالیت زیستی دارند و از میان این پروتیین های جداسازی شده از جلبکهای پرسلولی می توان به لکتین ها اشاره کرد که به کربوهیدراتها باند می شوند و در بسیاری از مراحل بیولوژیک مثل ارتباطات درون سلولی شرکت دارند. آنها علاوه بر خواص ضدباکتریایی، دارای خواص ضد ویروسی و ضد التهابی نیز می باشند می باشند (Cunningham و همکاران، ۲۰۱۰) و یکی از مهمترین موادی هستند که باعث تحریک سیستم ایمنی میگوها می شوند (دشتیان نسب و همکاران، ۱۳۸۸).

جلبکهای دریایی همچنین دارای مقادیر قابل توجهی اسیدهای چرب امگا ۳ می باشند که دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می باشند (Pulz و Gross، ۲۰۰۴؛ Plaza و همکاران، ۲۰۱۰). در یک پژوهش دیده شده عصاره لیپیدی جلبک *Gracillariopsis longissima* که حاوی سطوح معنی داری از اسیدهای چرب امگا ۳ بود دارای خواص ضدباکتریایی علیه پاتوژنهای آبزیان می باشد، لذا از این عصاره به عنوان مکمل غذای ماهیان پیشنهاد شده است (Stabili و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین مشخص شده است که ساختارهای دیگری نیز در اسیدهای چرب موجود در جلبکهای دریایی شامل گلیکولیپیدها، استروئیدها، اسیدهای فنولیک، ترپنوئیدها، اسید لوریک، اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک، اسید اولئیک و اسید استئاریک نیز دارای خواص و پتانسیل آنتی بیوتیکی هستند (Youngsblood و همکاران، ۱۹۷۱).

یکی از مهمترین عواملی که در جلبکهای دریایی وجود دارند و دارای خواص آنتی میکروبی هستند، پلی فنولها می باشند که علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی قوی دارای خواص آنتی میکروبی نیز می باشند (Gupta و Abu-Ghannam، ۲۰۱۱). از میان پلی فنولها، فلوروتانن[۶۴] مهمترین عامل آنتی باکتریایی است که فقط در گیاهان دریایی وجود دارد (Li و همکاران، ۲۰۱۱)

با توجه به ممنوع بودن استفاده از آنتی بیوتیک ها در مراحل تکثیر وپرورش آبزیان شامل ماهی و میگو، لازم است که روشهای جایگزین یا مواد جدید برای کنترل بیماریهای عفونی آبزیان مشخص شود. تاکنون مشخص شده است که حداقل برخی از سویه های *V.harveyi* جداسازی شده از مراکز تکثیر استان بوشهر نسبت به برخی آنتی بیوتیکها مقاوم هستند (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۲). هم اکنون کنترل این پاتوژنها توسط برخی باکتریهای پروبیوتیک یا سایر ترکیبات فعال زیستی امکان پذیر شده است (Rengpipat و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج این مطالعه نیز یک گزینه دیگر یعنی عصاره های ارگانیک جلبک های دریایی برای درمان این پاتوژنها پیشنهاد می دهد هر چند برای اثبات کامل و جزییات استفاده نیاز به مطالعات بیشتری است.

---

[64] Phlorotannins

۲-۵- فعالیت آنتی اکسیدانی

رادیکالهای آزاد مولکولهای بیش فعالی هستند که یک الکترون منفرد در مدار خارجی خود دارند که در این حالت به شدت واکنش پذیر و بی ثبات می باشند. رادیکالهای آزاد معمولا از طریق انرژی تابشی (اشعه UV و X) یا در اثر واکنش های شیمیایی انجام شده طی فرآیندهای متابولیسم طبیعی در بدن ایجاد می گردند. رادیکالهای آزاد سر منشا واکنش زنجیره ای تخریب و فروپاشی غشای سلولی و ترکیبات درون سلولها از قبیل چربیها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک هستند. علاوه بر تخریب سلولها، مهمترین عامل اکسیداسیون چربیها نیز می باشند و از این طریق باعث فساد و بوی نامطبوع مواد غذایی می گردند. از اینرو استفاده از یک آنتی اکسیدان ممکن است باعث ایجاد اثرات درمانی و یا تازه ماندن تولیدات غذایی شود، از طرفی ترکیبات آنتی اکسیدانی با خنثی کردن و حذف رادیکالهای آزاد مثل هیدروپراکسیدها و پیروکسیل های چربی باعث کاهش استرس اکسیداتیو در سلولها شده و از این طریق از بیماریهای مرتبط با استرس اکسیداتیو در موجودات زنده پیشگیری کنند (Stirk و Van Staden، ۱۹۹۷). بسیاری از آنتی اکسیدانهای مصنوعی، اثرات سمی و جهش زا[۶۵] نشان داده اند که این امر باعث تغییر جهت به سمت استفاده از آنتی اکسیدانهای طبیعی شده است (Khan و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به تشخیص خواص آنتی اکسیدانی در بسیاری از جلبکهای دریایی (Khan و همکاران، ۲۰۰۹) پژوهش و کار شناسایی آنتی اکسیدانها از گیاهان دارویی و جلبکهای دریایی از عرصه هایی است که سریعا رشد کرده است. سالانه تعداد زیادی از این گیاهان خشکی و دریایی به منظور ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی و با روشهای بسیار متنوع مورد بررسی قرار می گیرند.

DPPH یک رادیکال آزاد با نیتروژن پایدار در مرکز است که به طور موثری توسط آنتی اکسیدانها قابل برداشت می باشد (MacKinnon و همکاران، ۲۰۱۰). از اینرو آزمون DPPH به عنوان یک روش سریع، قابل اعتماد و ارزان، به فراوانی برای ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات طبیعی شامل عصاره های گیاهی و جلبکهای دریایی مورد استفاده قرار می گیرد (Molyneux، ۲۰۰۴). آزمون DPPH همچنین یک روش خوب و کارا برای بررسی برداشت رادیکالهای پراکسیل است (Stabili و همکاران، ۲۰۱۲).

در این مطالعه توانایی عصاره های مختلف جلبکهای مورد آزمون در حذف و برداشت رادیکال آزاد DPPH با کاهش جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج نشان داد، همه جلبکهای دریایی مورد آزمون و جداسازی شده از سواحل خلیج فارس دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی از طریق حذف رادیکالهای آزاد می باشند. در این پژوهش بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در بین عصاره ها مربوط به عصاره آبی آنها بود که با مطالعات دیگر نیز مطابقت دارد (Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲)، جایی که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی و اتانولی ۴ جلبک دریایی خوراکی (به نامهای تجاری Nori[۶۶]، Kumbu[۶۷]، Wakame[۶۸] و Hijki[۶۹]) خریداری شده از

---

[65] motagenic
[66] *Prophyra sp.*
[67] *Laminaria sp.*

سوپر مارکتی در مالزی با هم مقایسه شد و نتایج نشان داد عصاره آبی همه جلبکها نسبت به عصاره اتانولی آنها اثرات آنتی اکسیدانی قویتری دارند. یا در مطالعه دیگری که عصاره آبی جلبک قهوه ای *Himathalia elongata* جداسازی شده از سواحل ایرلند نسبت به عصاره متانولی همان جلبک دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قویتری بوده است (Rajauria و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی جلبک قهوه ای *S.boveanum* جداسازی شده از سواحل استان بوشهر دیده شده بود که عصاره آبی جلبک مذکور حدود ۱۰ برابر اثر آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره اتانولی آن دارد (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین در این مطالعه دیده شد پس از عصاره های آبی در اکثر موارد عصاره های متانولی و اتانولی اثرات آنتی اکسیدانی قویتری داشتند و در بیشتر مواقع اثر آنتی اکسیدانی عصاره های کلروفرمی از بقیه عصاره ها کمتر بود. برخی پژوهشگران دلیل آنرا به میزان قطبیت حلال وابسته می دانند (Zhou و Yu، ۲۰۰۴) که در حلالهای قطبی متابولیتهای موثرتری از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی استخراج می شوند. در برخی موارد هم گزارش شده که بر عکس عصاره های جلبکی بدست آمده در حلالهای غیر قطبی مثل اتیل استات[۷۰] و هگزان[۷۱] اثرات آنتی اکسیدانی موثرتری نسبت به عصاره های جلبکی بدست آمده در حلالهای قطبی مثل اتانول داشتند (Indu و Seenivasan، ۲۰۱۳).

از طرفی در غلظت mg/ml ۲ عصاره های مختلف، عصاره آبی جلبک قرمز *G.corticata* با ۶/۴٪ ± ۷۵٪ بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر جلبکهای مورد آزمون از خود نشان داد و پس از آن عصاره آبی جلبک قهوه ای *S.angustifolium* با مهار ٪۴ ± ۶۹٪ رادیکال آزاد در رتبه دوم قرار داشت هرچند که اختلاف آماری وجود نداشت. در پژوهش قبلی عصاره آبی *S.boveanum* در غلظت mg/ml ۳ توانسته بود ۹۴٪ فعالیت رادیکال آزاد DPPH را مهار کند (Rastian و همکاران، ۲۰۰۷) و این عدد تا غلظتmg/ml ۱۰ ثابت باقی مانده بود در حالیکه عصاره آبی جلبکهای *G.corticata* و *S.angustifolium* در غلظت mg/ml ۸ توانسته بودند تا ۹۸٪ فعالیت رادیکال آزاد DPPH را مهار کنند، سایر جلبکها همانطور که در نمودارهای ۴-۱ تا ۴-۴ دیده شد فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری داشتند. فعالیت برداشت رادیکال آزاد سایر عصاره های جلبکهای مورد مطالعه کمتر از عصاره آبی آنها بود که البته میزان آنها نیز قابل توجه بود مثلا عصاره متانولی جلبکهای *G.corticata* و *S.angustifolium* در غلظت mg/ml ۲ توانسته بودند به ترتیب ٪۵ ± ۷۲٪ و ٪۳ ± ۵۸٪ از رادیکال آزاد را حذف کنند که در مقایسه با مطالعات قدرت آنتی اکسیدانی خوبی محسوب می شود. در پژوهشی در هند عصاره های اتانولی جلبکهای *S.wihgtii*، *Gratolupia litophilia* و *Chaetomorpha linum* با غلظت mg/ml۱ به ترتیب ۷۲٪، ۵۲٪ و ۴۱٪ باعث مهار رادیکال آزاد DPPH شده بودند (Indu و Seenivasan، ۲۰۱۳).

---

[68] *Undaria sp.*
[69] *Hijkia sp.*
[70] Ethyl asetate
[71] Hexan

گزارشهای زیادی در مقایسه اثرات آنتی اکسیدانی گروههای مختلف جلبکها وجود ندارد؛ اما در برخی از این بررسیها نتایج متفاوتی وجود داشته است، چندین بررسی نشان داده اند که جلبکهای قهوه ای آنتی اکسیدانهای قویتری نسبت به جلبکهای قرمز می باشند (Sachindra و همکاران، ۲۰۰۷؛ Matsukawa و همکاران، ۱۹۹۷) برخی از مطالعات نیز اثر آنتی اکسیدانی جلبکهای قرمز را نسبت به سایر جلبکها بیشتر گزارش کرده اند (Anggadiredjal و همکاران، ۱۹۹۷؛ Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲). عده ای هم اعلام کرده اند، جلبکهای سبز اثرات آنتی اکسیدانی قویتری نسبت به سایر گروهها داشته اند (Mayalen و همکاران، ۲۰۰۷). ولی در این مطالعه جلبک سبز *C.iyengarii* کمترین اثر آنتی اکسیدانی نسبت به سایر جلبکهای قرمز و قهوه ای داشت همانطور که در پژوهشی بر روی خواص آنتی اکسیدانی جلبکهای جداسازی شده از سواحل اقیانوس هند دیده شده بود (Indu و Seenivasan، ۲۰۱۳). جلبک های سبز پس از جلبکهای قرمز کمترین اثر آنتی اکسیدانی داشتند و جلبکهای قهوه ای خواص آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند.

همچنین در این پژوهش دیده شد، با افزایش غلظت، فعالیت آنتی اکسیدانی در همه عصاره های جلبکی و آنتی اکسیدان استاندارد (ویتامین C) فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی داری افزایش پیدا می کند که با تحقیقات پیشین مطابقت داشت (Zhou و Yu، ۲۰۰۴؛ Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲).

نتایج EC_{50} عصاره های مختلف جلبکی نشان می دهد چه مقدار غلظتی از عصاره لازم است تا ۵۰٪ رادیکال آزاد حذف شود و هر چه مقدار آن کمتر باشد بیانگر قدرت آنتی اکسیدانی بیشتر است. در این مطالعه کمترین غلظتی از عصاره ها که توانسته بود نیمی از رادیکال آزاد DPPH را از محیط حذف کند مربوط به عصاره های آبی جلبک های به ترتیب *K.alvarezii*، *G.cortiacata*، *S.angustifolium*، *L.snydriae*، *S.ilicium*، *P.borgesseni* و در آخر جلبک سبز *C.iyengarii* بود که به نظر می رسد بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در این مطالعه مربوط به جلبکهای قرمز و کمترین آن مربوط به جلبک های سبز باشد. در این مطالعه کمترین غلظتی از عصاره جلبکی که توانسته نیمی از رادیکال آزاد DPPH را برداشت کند متعلق به عصاره آبی جلبک قرمز *K.alvarezii* بود و برابر با ۰/۲mg/ml ± ۱ بود و پس از آن نیز جلبک قرمز *G.cortiacata* با ۰/۱ mg/ml ± ۱/۲ بود، در پژوهشهای پیشین EC_{50} عصاره متانولی جلبکهای *G.cornea* و *G.birdiae* جداسازی شده از سواحل برزیل به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۷۷ میلیگرم در میلی لیتر بدست آمده بود (Bartolomeo و همکاران، ۲۰۱۱). EC_{50} عصاره های اتانولی و متانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* جداسازی شده از سواحل اقیانوس هند به ترتیب برابر ۳/۰۳ و ۴/۲۸ میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شده بود (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸). در حالیکه بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی جلبکهای خوراکی سواحل ایرلند نیز بررسی شده است (Cox و همکاران، ۲۰۱۰). در این مطالعه مشخص شد عصاره خشک متانولی جلبک قهوه ای *Laminaria digitata* در بین سایر عصاره ها به طور معنی داری دارای میزان ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری برای برداشت رادیکال آزاد مولکول DPPH می باشد به طوریکه غلظت برداشت ۵۰٪ رادیکال آزاد (EC_{50}) عصاره متانولی ۰/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. در تحقیق دیگری نیز

EC_{50} عصاره آبی – متانولی جلبک *Hemanthalia elongate*، معادل ۰/۵۷ پی پی ام بدست آمد (Rajauria و همکاران، ۲۰۱۲) که این ارقام پایین نشان می دهد، جلبکهای مناطق سرد و یا جلبکهای جداسازی شده در فصول سرد از فعالیت بیواکتیوی بیشتری برخوردارند.

در مطالعه حاضر EC_{50} عصاره های اتانولی و متانولی جلبک قرمز *K.alvarezii* جداسازی شده از سواحل خلیج فارس به ترتیب ۰/۲۸ ± ۲/۱ و ۰/۴ ± ۲ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. همچنین در این مطالعه بیشترین EC_{50} برای عصاره متانولی جلبک سبز *C.iyengarii* با میانگین ۱/۲۵mg/ml ± ۱۲ بدست آمد. همان طور که ملاحظه می شود در برخی از موارد عصاره هایی که انتظار می رود فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری داشته باشند کمترین فعالیت را داشتند که این مورد در پژوهشهای قبلی هم ملاحظه شده است مثلا در یک مطالعه عصاره آبی جلبکهای Noori و Kambu از عصاره الکلی آنها اثرات آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند اما در همان مطالعه دیده شده بود که عصاره الکلی جلبکهای Wakame و Hijki اثرات آنتی اکسیدانی قویتری نسبت به عصاره آبی آنها دارد (Ismaeil و Hong، ۲۰۰۲). همچنین این نتایج با نتایج پژوهش های دیگری نیز پشتیبانی می شود (Duffy و Power، ۲۰۰۱) در گزارشی توصیف شده که نمونه های مختلف جلبکی در حلالهای مختلف اثرات آنتی اکسیدانی متفاوتی نشان می دهند.

تاکنون مشخص شده که چندین ترکیب شیمیایی در جلبکهای دریایی نقش آنتی اکسیدانی دارند که از بین آنها می توان به پلی فنلها اشاره کرد. پلی فنلها توسط اکثر گیاهان از جمله جلبکهای دریایی تولید می شوند (Duan، ۱۹۸۸). ترکیبات فنلی آنتی اکسیدانهای قوی هستند، آنها از طریق چلاته شدن[۷۲] با اتمهای فلزی، از شکل گیری رادیکالهای آزاد پیشگیری کرده و باعث فعال سازی سیستم آنتی اکسیدانی داخل بدن موجودات زنده می شوند (Al-Azzawie و Mohammed-Saiel، ۲۰۰۶). عبارت ترکیبات فنلی بیش از چند صد مولکول را توصیف می کند که در ساختار خود یک حلقه بنزنی و حداقل یک گروه کربوکسیل دارند (Manach و همکاران، ۲۰۰۴). از میان پلی فنلها، اسید فنولیک، فلاونوئیدها، ایزوفلاوونها، اسید سینامیک، اسید بنزوئیک، کیورکتین[۷۳] و لیگنانها قابل توجه می باشند (Gupta و Abu-Ghannam، ۲۰۱۱؛Keyrouz و همکاران، ۲۰۱۱). جلبکهای دریایی این ترکیبات را برای محافظت ازخود در شرایط استرس و رهایی از گیاهخواران تولید می کنند (Li و همکاران، ۲۰۱۱). اکسیژن فعال (ROS) تولید شده طی متابولیسم داخلی موجودات، باعث اخلال در عملکرد و مسمومیت داخلی می شود (Alviano و Alviano، ۲۰۰۹). عصاره های جلبکی دارای مقادیر مناسب از پلی فنلها هستند ولی این میزان قویا با روش استخراج عصاره وابسته است. گونه های *Ascophyllum spp.* از جلبکهای قهوه ای به میزان معنی داری بیشتر از سایر گونه ها ترکیبات پلی فنلی دارند و در *Ulva spp.* میزان پلی فنلها در کمترین حد است (Keyrouz و همکاران، ۲۰۱۱؛ Craige، ۲۰۱۱).

---

[72] Chelating
[73] Querectin

۳-۵- رشد و بازماندگی

با توجه به نتایج LC_{50} و سمیت[۷۴] عصاره های مختلف برای ناپلی آرتمیا، در آزمونهای درون تن از عصاره اتانولی جلبکهای مختلف استفاده شد. کلا در مقوله سمی بودن یا نبودن یک عصاره برای ناپلی آرتمیا، دامنه مشخصی از LC_{50} در نظر گرفته می شود که LC_{50} در دامنه ۰-۸۰μg/ml به عنوان دز سمی شدید، دامنه ۸۰-۲۵۰ μg/ml سمیت متوسط و بیشتر از ۲۵۰ μg/ml به عنوان دز سمی ضعیف اتلاق می گردد (Ramos و همکاران، ۲۰۰۹). در این مطالعه LC_{50} عصاره اتانولی جلبکهای مختلف برای ناپلی آرتمیا در ۲۴ ساعت، در گستره ۵۸۰-۳۸۰۰ μg/ml بدست آمد که کمترین و بیشترین آن به ترتیب متعلق به جلبک های *S.ilicifolium* و *G.corticata* بود. LC_{50} سایر عصاره ها بین این دو مقدار قرار داشت و در کل ترتیب سمیت آنها به صورت *S.ilicifolim> S.angustifolium> K.alvarezii> C.iyengarii> L.snyderiae> P.borgesseni> G.corticata* بود. در مطالعات پیشین نیز سمیت عصاره های گونه های سارگاسوم نسبت به گونه های دیگر قویتر بدست آمده بود، به طوریکه LC_{50} جلبکهای *S.marginatum*، *S.variable* و *S.aspermum* طی ۲۴ ساعت حدود ۱۰۰ μg/ml گزارش شده بود و همچنین دز ۵۰۰μg/ml باعث شده بود همه ناپلی ها طی ۲۴ ساعت تلف شوند (Rashmi و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه دیگری نیز سمی ترین جلبک از بین چندین جلبک مورد مطالعه، برای ناپلی آرتمیا جلبک *S.asperum* بود (Ara و همکاران، ۱۹۹۹). در تحقیق دیگری میزان LC_{50} عصاره اتانولی جلبک *G.fisheri* برای ناپلی آرتمیا برابر ۴/۳mg/ml بدست آمد که به نتیجه مطالعه ما نزدیک است (Kanjana و همکاران، ۲۰۱۱).

همچنین LC_{50} همه عصاره ها برای ناپلی آرتمیا وابسته به دز بود به نحوی که با افزایش دز عصاره، میزان تلفات آرتمیا بیشتر می شد.

تعداد باکتریهای (*Vibrio spp.*) موجود در بافت بچه میگوهایی که در محیط کشت حاوی باکتری پرورش پیدا کرده بودند به میزان قابل توجهی نسبت به گروه کنترل منفی که در محیط فاقد باکتری تلقیح شده (به صورت دستی) پرورش یافته بود، بیشتر بود؛ اما شمارش ویبریوها[۷۵] نشان داد، میزان باکتری در بافت بچه میگوهایی که از آرتمیای غنی سازی شده توسط عصاره الکلی جلبکها تغذیه شده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت کمتر بود. این امر نشان داد که عصاره های اتانولی همه جلبکها و در همه دزها قادر بوده اند نسبت به جیره غذایی گروه کنترل بر بیماری ویبریوزیس موثر باشند. این نتیجه با پژوهشهای پیشین نیز مطابقت دارد. قبلا دیده شده بود، پست لاروهای (PL_{1-25}) میگوهای منودون پرورش یافته در آب حاوی باکتری، میزان بار باکتریایی در روده و سایر بافتهای آنها افزایش یافته بود در حالیکه گروههایی از بچه میگوها که عصاره متانولی برخی گیاهان دارویی از طریق غنی سازی آرتمیا دریافت کرده بودند، بار آلودگی کمتری در روده و سایر بافتهای خود نشان دادند (و Citrasu، ۲۰۱۰). در یک تحقیق مشابه با این مطالعه نیز بچه میگوهای سفید هندی در محیط واجد باکتری

[74] Toxic
[75] Vibrio count

V.parahemolyticus پرورش داده شده بودند، نتایج مطالعه نشان داد بچه میگوهایی که از آرتمیای غنی سازی شده توسط چند گونه گیاه دارویی و یا دو گونه جلبک دریایی در جیره غذایی خود استفاده کرده بودند نسبت به بچه میگوهایی که از آرتمیای غنی سازی نشده استفاده کرده بودند به میزان قابل توجهی آلودگی باکتریایی کمتری در هپاتوپانکراس و سایر بافتهای آنها دیده شده بود (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج این تحقیق نشان داد درصد بقای بچه میگوهایی که در محیط فاقد باکتری تلقیح شده به محیط، پرورش یافته بودند بیشتر از گروههایی بودند که در محیط حاوی باکتری پرورش پیدا کرده بودند و این نشانگر بیماریزا بودن دز باکتری مورد استفاده بوده است. در این مطالعه همچنین مشاهده شد که نه تنها گروههای تیمار میزان بار آلودگی باکتریایی کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند بلکه از بازماندگی بیشتری نیز به نسبت گروه کنترل مثبت برخوردار بودند که این امر نشان دهنده کنترل موفقیت آمیز ویبریوزیس توسط عصاره اتانولی جلبکهای دریایی مورد استفاده در آزمون بوده است. کنترل موفقیت آمیز پاتوژنهای میگو مثل *V.parahemolyticus* و *V.damsela* پیش از این نیز از طریق غنی سازی آرتمیا توسط عصاره بوتانولی گیاه دارویی *W.samnifera* گزارش شده بود (Citrasu، ۲۰۱۰).

در این مطالعه پس از گروه کنترل منفی (محیط فاقد باکتری)، بیشترین درصد بقا متعلق به گروه G (۶۰۰) با ۶/۶±۷۹/۴ درصد و پس از آن گروه S (۳۰۰) و K (۶۰۰) با میزان به ترتیب ۷/۳±۷۳/۳ و ۶/۶±۷۰/۶ درصد بود که نسبت به گروه کنترل مثبت با درصد بقای ۶/۶±۳۳/۳ اختلاف معنی داری داشتند، همان طور که در نمودار ۱۲-۴ نشان داده شده سایر گروههای آزمون نیز درصد بقای بیشتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند که معنی دار بود. این نتایج نشان از نقش درمانی این جلبکها در ویبریوزیس در شرایط درون تن دارد. همانطور که در پژوهشی عصاره متانولی جلبک قرمز *Asparagopsis sp.* بدست آمده از سواحل هندوستان موقعی که در جیره غذایی میگوهای مونودون به مدت ۴ هفته استفاده شده بود، توانسته بود از تلفات ناشی از ویبریوزیس در میگوهای گروه تیمار به نسبت گروه شاهد پیشگیری کند (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین در یک تحقیق استفاده از عصاره جلبک قرمز *K.alvarezii* به میزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در پرورش لاروی[۷۶] میگوی مونودون و همراه با آلودگی مصنوعی ایجاد شده توسط *ویبریو هاروی* باعث شده بود تلفات تجمعی پست لاروهای گروه تیمار طی ۳۰ روز پرورش، به میزان ۲۹/۷ درصد نسبت به گروه کنترل کمتر باشد (Sivakumar و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه قبلی این گروه نیز موثر بودن عصاره های جلبکهای دریایی *Skeletonema costatum*، *Ulav fasciata* و *K.alvarezii* بر کنترل ویبریوهای درخشان[۷۷] (ویبریوزیس) تایید شده بود (Sivakumar و Kannappan، ۲۰۱۳).

[76] Larviculture
[77] Luminescence

در پژوهش های متعددی از جلبکهای دریایی یا عصاره های آنها در مدیریت و کنترل بیماریهای باکتریایی میگوها استفاده شده است (Jose و همکاران، ۲۰۰۸؛ Lipton و همکاران، ۲۰۰۹؛ Selvin و همکاران، ۲۰۰۹).

از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تاثیر عصاره های جلبکی در محیط پرورش حاوی باکتری (*V.harveyi*) وابسته به دز بود به طوریکه در اکثر موارد استفاده از دزهای بالاتر جلبک موجب کاهش میزان تلفات میگوها ناشی از ویبریوزیس شده بود. در مطالعه مشابهی که از عصاره متانولی جلبک سبز *Acrosiphonia orientalis* با دزهای مختلف (۱۲۰۰، ۸۰۰، ۴۰۰ و ۱۶۰۰mg/kg feed) برای کنترل تلفات و بیماری در میگوهای منودون آلوده شده توسط باکتری *V.harveyi* استفاده شده بود، دیده شد، در دزهای پایین (۴۰۰ و ۸۰۰) نسبت به دز بالاتر (۱۲۰۰mg/kg) میزان تلفات میگوها بیشتر بود و همچنین میزان بار آلودگی باکتریایی در بافت میگوهای زنده مانده نیز نسبت به دز بالاتر، بیشتر بود. از طرفی در دز ۱۶۰۰mg/kg شدت عفونت و آلودگی به باکتری *V.harveyi* نسبت به بقیه بیشتر بود به نحویکه ۵۲٪ میگوهای باقیمانده دارای آلودگی به باکتری بودند در حالیکه در دز ۱۲۰۰mg/kg تنها ۳۱٪ میگوهای باقیمانده آلودگی به باکتری مذکور داشتند (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲) و نویسندگان این دز را به عنوان موثرترین دز معرفی کردند.

جلبکهای دریایی منبع مهمی از تعداد زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره بلند (PUFA)، کاروتنوییدها، فیکوبیلی پروتئینها[۷۸]، پلی ساکاریدها و فیکوتوکسین[۷۹] می باشند (Chu، ۲۰۱۲). گزارش شده که این لیپیدها می توانند طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها را از طریق تخریب غشای سلولی مهار کنند (Bergsson و همکاران، ۲۰۱۱). مشخص شده که اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع می توانند از چسبیدن اولیه باکتریها به سطوح مختلف و تشکیل بیوفیلم ممانعت کنند (Davis و Marques، ۲۰۰۹). اساس کار اسیدهای چرب با زنجیره بلند (بیش از ۱۰ اتم کربن) در تخریب باکتریها، اثر بر پروتوپلاسم سلول و شکستن این ارگانل سلولی می باشد. در شرایط بد محیطی در جاهایی که تراکم جلبکهای پرسلولی بالا باشد، این جلبکها دفاع موثر خود را با افزایش ترکیبات بیواکتیو متنوع خود شامل پلی ساکاریدها، پلی فنل ها، اسیدهای چرب و پپتیدها آغاز می کنند (Tierney و همکاران، ۲۰۱۰).

این تحقیق نشان داد پارامترهای رشد در همه گروههای تیمار که از عصاره اتانولی جلبکهای مختلف با دزهای متفاوت استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل مثبت بهتر بود یعنی اینکه عملکرد رشد در گروههای تیمار بهبود پیدا کرده بود. بیشترین وزن کسب شده و همچنین بالاترین درصد نرخ رشد ویژه متعلق به گروهی از تیمارها بود که از غلظت پایین عصاره اتانولی جلبک *G.corticata* استفاده کرده بود و پس از آن تیمار غلظت بالای همین عصاره قرار داشت و سپس گروه کنترل منفی قرار داشت که تفاوت این سه گروه با یکدیگر معنی دار نبود ولی با توجه به بالاتر بودن درصد بازماندگی (بقاء) پست لاروها در گروه غلظت بالای جلبک

[78] Pycobiliproteins
[79] Pycotoxins

گراسیلاریا، به نظر می رسد پس از گروه کنترل منفی که در شرایط فاقد باکتری و بدون استرس رشد کرده بود، تیمار غلظت بالای عصاره جلبک گراسیلاریا از عملکرد بهتری نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل مثبت برخوردار بوده است.

مطالعات پیشین نیز تا حدودی این مطلب را روشن می کنند هرچند در بسیاری از مطالعات تنها یک جلبک یا دو جلبک را با گروه کنترل مورد مقایسه قرار داده اند (Briggs و Funge-Smith، ۱۹۹۶؛ Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷).

در یک مطالعه مشابه این تحقیق نرخ رشد ویژه در بچه میگوهای سفید هندی تغذیه شده توسط آرتمیای غنی شده با عصاره جلبکهای دریایی *U.lactuta* و *S.weihtii* به ترتیب ۱/۹۵ درصد و ۱/۵۴ درصد بدست آمد که نسبت به گروه کنترل با نرخ رشد ۱/۱۱ درصد عملکرد بهتری داشتند (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج یک تحقیق که به منظور بررسی ارزش غذایی جلبک قرمز *G.cervicornis* برای میگوهای جوان وانامی و عملکرد رشد میگوهای مذکور انجام شده بود، نشان داد که جایگزینی ۵۰٪ جیره توسط پودر این جلبک موجب رشد و بازماندگی مناسب این میگوها در شرایط آزمایشگاهی شده بود و محققین پی بردند، در صورتی که جیره غذایی به طور ۱۰۰ درصد توسط پودر جلبک تامین شود به میزان قابل توجهی رشد و بقای میگوها نسبت به گروه کنترل و تیمار ۵۰ درصد کاهش می یابد (Marinho-Soriano و همکاران، ۲۰۰۷).

همچنین این مطالعه نشان داد که افزایش وزن بدست آمده با استفاده از عصاره اتانولی جلبک های مختلف وابسته به دز بوده که در مورد جلبکهای مختلف نتایج متفاوت حاصل شده، مثلا دز پایین جلبک های *G.corticata* و *K.alvarezii* نسبت به دز بالاتر میزان افزایش وزن بیشتری ایجاد کرد. در مورد جلبکهای *S.angustifolium* و *L.snyderiae* که از سه دز استفاده شده است، دز میانی نسبت به دزهای پایین و بالا موثرتر واقع شد. در مطالعات قبلی هم برخی محققین بیان کرده بودند که استفاده از عصاره جلبکهای مختلف یا پودر جلبکهای دریایی می تواند باعث بهبود رشد میگوها شود که وابسته به دز بوده است، مثلا در یک مطالعه که از عصاره متانولی جلبک قهوه ای *S.wightii* با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم غذای بچه میگوی منودون استفاده شده بود، بالاترین بقا مربوط به دزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بود (۹۶/۶٪) و دز ۲۰۰ میلی گرم و گروه کنترل به ترتیب با ۹۳/۳ درصد و ۸۳/۳ درصد بقای کمتری نسبت به دو گروه قبلی داشتند. نتایج عملکرد رشد نیز نشان داد دز ۳۰۰ میلی گرم عملکرد بهتری داشت و ضریب تبدیل غذایی آن ۱/۲۱ بود در حالیکه در گروه ۱۰۰ میلی گرم و کنترل با ۱/۳۲ و ۱/۵۸ در رتبه های بعد قرار داشتند (Huxley و Lipton، ۲۰۱۰).

در پژوهش Penaflorida و Golez (۱۹۹۶) مشاهده شد که میگوهای جوان وانامی (۲۰۰ میلی گرمی) که از جیره غذایی حاوی ۵٪ پودر جلبک *K. alvarezii* استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل (۰٪) و گروه ۱۰٪ پودر جلبک مذکور بیشترین وزن بدست آورده بودند. در مطالعه دیگری از پودر جلبک یک نوع سارگاسوم به میزان

۴-۲ درصد یا پودر کلپ (*Macrosystis pyrifera*) به میزان ۴٪ به عنوان همبند[۸۰] در جیره غذایی میگوها استفاده کردند (Suarez-Garcia، ۲۰۰۶)، نتیجه ای همانند گروه کنترل (۳٪ آلژینات خالص) بدست آوردند. همچنین گزارش شده (Cruz-Suarez و همکاران ۲۰۰۸)، موقعی که ۱۰٪ از پودر جلبک کلپ در آب حل کرده و روی جیره غذایی میگو می پاشند باعث افزایش رشد می شود ولی با افزایش آن به میزان ۱۵ و ۲۰ درصد موجب کاهش رشد میگو می گردد. اثرات جایگزینی جلبک *G.cervicornis* به جای آرد گندم و پودر سویا در جیره غذایی میگوی مونودون بررسی شده است (Briggs و Funge-Smith،۱۹۹۶)، آنها دریافتند که جیره های حاوی ۱۵-۰ درصد پودر گراسیلاریا، نرخ رشد ویژه بین ۸-۷/۹ درصد برای میگوها ایجاد می کند اما موقعی که میزان پودر جلبک به ۳۰ درصد جیره افزایش یافت، نرخ رشد ویژه به ۷/۳ درصد کاهش پیدا کرد. همچنین در یک مطالعه دیگر از جلبکهای *K. alvarezii* و *G.heteroclada* به عنوان بایندر در جیره غذایی میگوهای جوان مونودون استفاده شد (Penaflorida و Golez، ۱۹۹۶)، نتایج این تحقیق نشان داد، جیره های حاوی ۱۰٪ جلبک *G.heteroclada* در ۴ ساعت بیشترین ماندگاری در آب داشت، اما اختلاف میان جیره ها در حداقل بود. سطوح مختلف میزان جلبکها (۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ درصد) در میزان بقای میگوها تفاوت معنی داری ایجاد نکرد؛ و نرخ رشد ویژه میگوها از ۳/۳ درصد در جیره حاوی ۱۵٪ جلبک *G.heteroclada* تا ۵/۲۱ درصد در جیره حاوی ۵ درصد جلبک *K. alvarezii* متغیر بود.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که عصاره همه جلبکهای مورد استفاده علاوه بر پیشگیری از ویبریوزیس، در عملکرد رشد بچه میگوها نیز موثر بوده است، یعنی اینکه این جلبکها دارای ارزش غذایی برای میگوها می باشند که در این میان جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* نسبت به بقیه جلبکها اثرات موثرتری بر رشد میگوها نشان داد. در مطالعات پیشین، ترکیبات شیمیایی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* جداسازی شده از سواحل خلیج فارس (سواحل استان بوشهر) که در تغذیه موثر هستند مورد بررسی قرار گرفته است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج این بررسی نشان داد که جلبک مذکور دارای حدود ۴۲٪ کربوهیدرات محلول و ۱۲٪ پروتیین و ۵٪ چربی بود که در موارد کربوهیدراتها و چربیها در بین ۸ جلبک مورد بررسی از بیشترین مقدار برخوردار بود و در مورد پروتیین نیز بین ۳ جلبک اول قرار داشت.

ترکیب شیمیایی جلبکهای مختلف و حتی یک جنس مثل گراسیلاریا ممکن است به دلایل تغییرات گونه و واریته، وضعیت فیزیولوژیک جلبک و شرایط مختلف محیطی متفاوت باشد؛ اما عموما جنس گراسیلاریا غنی از پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای، ویتامین ها و مینرالها می باشد (Mabeau و Fluerence، ۱۹۹۳؛ Wong و Cheung، ۲۰۰۰). در مورد ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی جلبک *G.cervicornis* اعلام شده که دارای ۶۳٪ کربوهیدرات، ۲۳ درصد پروتیین و ۰/۵ درصد لیپید می باشد که گفته شده به عنوان مکمل می تواند در جیره غذایی میگوی وانامی استفاده شود ولی به طور کامل همه احتیاجات این میگو را برآورده نمی کند (Cuzon و همکاران، ۲۰۰۴).

[80] Binder

در هر صورت مطالعه حاضر نشان داد استفاده از عصاره های اتانولی تعدادی از جلبکهای موجود در خلیج فارس در قسمتی از جیره غذای مرحله پست لاروی بچه میگوهای وانامی می تواند علاوه بر پیشگیری از آلودگیهای باکتریایی رایج در هچریهای میگو باعث بهبود شرایط رشد و بازماندگی نیز خواهد شد.

۴-۵- مقاومت به ویبریوزیس

باکتریهای خانواده ویبریو همچنان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر و تلفات در صنعت پرورش میگوی جهان می باشد، بطوریکه طی چندسال اخیر به مهمترین عامل خسارت و کاهش تولید میگوی پرورشی جهان تبدیل شده است (Flegel، ۲۰۱۲؛Tran و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از جلبکهای دریایی یا متابولیتهای آنها برای کنترل پاتوژنهای عفونی میگوها بخصوص ویبریوزیس توسط پژوهشگران متعددی گزارش شده است (Hou و Chen، ۲۰۰۵؛ Selvin و همکاران، ۲۰۱۱).

در این تحقیق تقریبا همه بچه میگوهای شاهدی که در معرض باکتری *V.harveyi* قرار نگرفته بودند زنده ماندند، در مقابل بیش از ۹۰ درصد بچه میگوهای شاهدی که بدون درمان توسط عصاره جلبکها در معرض باکتری قرار گرفتند طی یک هفته تلف شدند و کلیه بچه میگوهایی که از طریق آرتمیای غنی سازی شده غلظتی از عصاره اتانولی یکی از جلبکهای دریایی دریافت کرده بودند در مواجهه با باکتری تلفات کمتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند. این نتایج توسط مطالعات زیادی پشتیبانی می شود، مثلا در مطالعه ای اثبات شده بود که غذای حاوی جلبک *Ulva* قادر است آلودگی ویبریویی در میگوی منودون را مهار کند (Selvin و همکاران، ۲۰۱۱). یا اینکه در تحقیق دیگری مشخص شده بود اگر عصاره جلبکهای دریایی به طور موثری (از طریق غنی سازی آرتمیا) در جیره اضافه شود باعث افزایش مقاومت بچه میگوی سفید هندی در برابر ویبریوزیس شده و میزان بقا و تولید را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد (Immanuel و همکاران، ۲۰۰۴). میگوهای موزی[۸۱] تغذیه شده توسط جلبک *S.plantensis* در برابر آلودگی *V.harveyi* مقاومت نشان داده بودند (Lee و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین مشاهده شده بود میگوهای وانامی درمان شده توسط عصاره آب گرم جلبک *G.tenuistipitata* از طریق تزریقی در برابر *ویبریو آلجینولیتیکوس* مقاومت نشان دادند (Hou و Chen، ۲۰۰۵).

براساس کار دیگری عصاره آب داغ *Cinnamomum kanehirae* توانسته بود از میگوهای سفید هندی در برابر *ویبریو آلجینولیتیکوس* محافظت کند (Yeh و همکاران، ۲۰۰۹).

از بین عصاره اتانولی جلبکهای *S.angustifolium*، *L.snyderiae*، *K.alvarezii* و *G.corticata* کمترین تلفات متعلق به عصاره اتانولی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* و بیشترین آن متعلق به *جلبک لورنسیا* اسنیدریا بود. همچنین نتایج این مطالعه مشخص کرد که هرچند میزان اثر عصاره جلبکها وابسته به دز بود اما همیشه دزهای بالا موثرتر نبود برای مثال دز ۴۰۰ میلی گرم عصاره اتانولی جلبک *L.snyderiae* میزان محافظت کنندگی بیشتری نسبت به دز

[81] *Fenneropenaeus merguiensis*

۶۰۰ میلی گرمی آن داشت و یا اثر محافظت کنندگی دزهای ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرمی جلبک *S.angustifolium* تقریبا بر هم منطبق بودند و اختلاف زیادی باهم نداشتند، لذا به نظر می رسد دزهای میانه این دو جلبک بتواند اثر مناسبی در کنترل ویبریوزیس در مرحله پست لاروی میگوی وانامی ایفا کند. این مورد نیز در پژوهشهای پیشین دیده شده است، بازماندگی بچه میگوهای منودون تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی مقادیر مختلف عصاره جلبک قرمز *Asparagopsis* (mg/kg ۲۸۵، ۵۷۵، ۸۵۰ و ۱۱۵۰) که در مواجهه با ۴ نوع باکتری خانواده ویبریو قرار گرفتند مورد بررسی قرار گرفت، در این مطالعه مشاهده شد دز mg/kg ۸۵۰ جلبک بهترین اثر درمانی در ویبریوزیس ایجاد شده دارد. اثر کنترلی دز ۲۸۵ با گروه شاهد معنی دار نبود، دز ۵۷۵ هرچند باعث افزایش بازماندگی شده بود اما میگوهای باقیمانده دارای آلودگی به ویبریو بودند، دزهای ۸۵۰ و ۱۱۵۰ با اختلاف معنی داری نسبت به سایر گروهها باعث افزایش بازماندگی بچه میگوها در ویبریوزیس شدند اما میزان آلودگی بچه میگوهای باقیمانده نسبت به ویبریوها در دز ۱۱۵۰ حدود ۵۵٪ بود در حالیکه در دز ۸۵۰ این آلودگی تنها ۳۷٪ گزارش شده است (Manilal و همکاران، ۲۰۱۲).

در مورد عصاره های اتانولی دو جلبک *G.corticata* و *K.alvarezii* به نظر می رسد دزهای بالاتر مناسب تر باشند هر چند تفاوت بین دز پایین و بالای جلبک گراسیلاریا معنی دار نیست.

۶-نتیجه گیری کلی

این تحقیق بیان می دارد که نه تنها عصاره اتانولی ۴ جلبک دریایی انتخاب شده از خلیج فارس به منظور پیشگیری ویبریوزیس در مراکز تکثیر میگو مفید است، بلکه مناسب بودن آن در رشد و بازماندگی بچه میگوها هم تایید شد. علاوه بر آن عصاره اتانولی ۴ جلبک مورد آزمون برای درمان بیماری ویبریوزیس در مراکز تکثیر میگو نیز قابل استفاده است.

پیشنهادها

- شناسایی و جداسازی مواد موثره مختلف جلبک‌های دریایی مختلف (ضدمیکروبی، ضداکسیدانی، محرک سیستم ایمنی و...)
- استفاده از ترکیبات موثره جداسازی شده به منظورهای مختلف (ضدمیکروبی، ضداکسیدانی، تغذیه، تحریک سیستم ایمنی و ...)
- استفاده از عصاره‌های جلبکی یا سایر محصولات آن‌ها در مراحل مختلف رشد میگوها
- جایگزینی ترکیبات گران‌قیمت جیره غذایی میگو و سایر آبزیان (برای مثال پودر ماهی) توسط جلبکهای دریایی
- کشت توام جلبکهای دریایی با آبزیان

منابع

۱. جلالی، محمد؛ عابدی، داریوش؛ اصغری، غلامرضا و رضایی، زینب (۱۳۸۶). بررسی اثر ضدمیکروبی چند نوع عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocycla spinosa*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۷(۵۹): ۸۶-۷۶.

۲. حیدری، محسن؛ ذوالقرنین، حسین؛ سخایی، نسرین؛ میرزایی، علی و موحدی نیا، عبدالعلی (۱۳۹۲). ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی عصاره هیدروالکلی برخی جلبکهای سواحل خلیج فارس در استان بوشهر. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۱(۱): ۶۲-۴۹.

۳. جمشیدی، مرجان؛ احمدی آشتیانی، حمیدرضا؛ رضازاده، شمسعلی؛ فتحی آزاد، فاطمه؛ مازندرانی، معصومه و خاکی، آرش (۱۳۸۹). بررسی و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی چند گونه گیاه بومی مازندران. فصلنامه گیاهان دارویی، ۲(۳۴): ۱۸۳-۱۷۷.

۴. ریاحی، حسین (۱۳۷۷). جلبک شناسی. جلد اول، انتشارات دانشگاه الزهرا، تهران، صفحات ۲۸-۱۱.

۵. سهرابی پور، جلوه و سرطاوی، کهزاد (۱۳۸۰). گزارش نهایی طرح فلور جلبکی استان بوشهر. مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان بوشهر. ۱۰۸ صفحه.

۶. عیوقی، فرنوش؛ برزگر، محسن؛ سحری، محمدعلی و نقدی بادی، حسنعلی (۱۳۸۸). بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس شوید در روغن سویا و مقایسه آن با آنتی اکسیدانهای شیمیایی، فصلنامه گیاهان دارویی. ۲(۳۰): ۸۳-۷۱.

۷. دشتیان نسب، عقیل؛ افشارنسب، محمد؛ قائدنیا، بابک؛ میربخش، مریم؛ یگانه وحید؛ کشتکار عیسی؛ فارسی، امید و شریفی، حسن. ۱۳۸۵. مطالعه اثر ارگوسان و ویبرومکس بر رشد و بازماندگی پست لاروهای میگوی وانامی و نقش آن درپیشگیری از بیماریهای ویبروزیس و لکه سفید میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات ۴۵-۱۸.

۸. کیان مهر، هرمزدیار. (۱۳۸۴). بیولوژی جلبکها. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات، ۲۵-۱۲.

۹. قرنجیک، بایرام محمد (۱۳۷۹). شناسایی جلبکهای دریایی سواحل استان سیستان و بلوچستان. مجله علمی شیلات ایران، ۹(۱): ۴۸-۳۷.

۱۰. قرنجیک، بایرام محمد (۱۳۸۲). شناسایی و تعیین پراکنش گیاهان دریایی مناطق زیر جزر و مدی در سواحل استان سیستان و بلوچستان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۲(۳): ۱۴۰-۱۲۷.

۱۱. قرنجیک، بایرام محمد و روحانی قادیکلایی، کیومرث (۱۳۸۹). اطلس جلبکهای دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۷۰ صفحه.

۱۲. قرنجیک، بایرام محمد؛ واین، مایکل؛ بنگ می، خیا؛ خواجه، سلیمه؛ کیانمهر، هرمزدیار و حسینی، محمدرضا (۱۳۹۰). مطالعه توده زنده جلبکهای قرمز دریایی دارویی در محدوده بین جزر و مدی ساحل چابهار. مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۳): ۱۱۴-۱۰۳.

۱۳. مصحفی، محمدحسن؛ منصوری، شهلا؛ شریفی فر، فریبا و خوشنودی، محمد (۱۳۸۵). اثرات ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه آویشن شیرازی در شرایط برون تن. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۴(۱): ۴۳-۳۳.

۱۴. مقیمی، اعظم؛ افشارنسب، محمد؛ دشتیان نسب، عقیل؛ مصباح، مهرزاد و یگانه، وحید (۱۳۹۲). بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های بیماریزای جداسازی شده از مراکز تکثیر میگو دراستان بوشهر. دو ماهنامه طب جنوب، ۱۶(۶): ۴۷۸-۴۶۷.

۱۵. نبی پور، ایرج و مراد حاصلی، (۱۳۸۰). جلبکهای دارویی خلیج فارس. انتشارات علوم پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر. صفحات ۴۵-۲۳.

16. Abraham, T.J. and Palaniappan R. (2004). Distribution of luminous bacteria in semi intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. Aquaculture, 232: 81-90.
17. Aguirre-Guzmán, G.; Ascencio, F. and Saulnier, D. (2005). Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. Disease of Aquatic Organisms. 67: 201–207.
18. Akhtar, P. and Sultana, V. (2002). Biochemical Studies of Some Seaweed Species From Karachi coast. Records Zoological Survey of Pakistan, 14, 1-4.
19. Al-Azzawie, H.F. and Mohamed-Saiel, S.A. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life Science, 78: 1371-1377.
20. Alviano, D.S. and Alviano, C.S. (2009). Plant extracts: search for new alterna-tives to treat microbial diseases. Current Pharmacology and Biotechnology, 10: 106-121.
21. Andriamanantoanina, H. and Rinaudo, M. (2010). Characterization of the alginates from five madagascan brown alga. Carbohydrate Polymers, 82: 555-560.
22. Anggadiredjal, J.; Andyani, R. and Hayati, M. (1997). Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* Phaeophyta and *Laurencia obtuse* Rhodophyta from Seribu Islands. Journal of Applied Phycology, 9: 477–479.
23. Ara, J.; Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Qasim, R. and Ahmad, V.U. (1999). Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). Phytotherapy Research, 13(4): 304–307.
24. Ballesteros, E.; Martin, D. and Uriz, M. J. (1992). Biological activity in Mediterranean macrophytes. Botanica Marina,35: 481 -485.
25. Bandara, B.M.R.; Gunatilaka, N.K.; Kumar, N.S.; Wimulasiri, W.R.; Adikaram, N.K.B. and Balasubramaniam, S. (1988). Antibacterial activity of some marine algae of Srilanka. J. Nat. Sci. Council Srilanka, 16:209-221.
26. Bansemir, A.; Blume, M.; Schröder, S. and Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture, 252: 79–84.
27. Bansemir, A.; Blume, M.; Schroder, S. and Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture. 252: 79–84
28. Bartle, S. (2005). The columbia Encyclopedia, VI Edition, Columbia University Press.
29. Bartolomeu, W. S.; Miguel, A. C.; Joana, T. M.; Mafalda, A. C. Q.;Antonio C. S. F.; Jose A. T. and Antonio A.V. (2011). Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. Journal of Agriculture Food Chemistry,59(10): 5589–5594.
30. Baticados, M.C.L. and Padihare, J.O. (1992). The use of chemotherapeutic agent in the Philippines. In: Shariff, I.M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Disease in Asian Aquaculture. Fish Section. Asian Fishery Society, Manila, Philippines, pp. 531– 546.
31. Baticados, M.C.L.; Lavilla-Pitigo, C.R.; Cruz-Lacicerda, E.R.; Delapena, L.D. and Sunaz, N. A. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Disease of Aquatic Organisms*, 9:133-139.
32. Bell, G.J.; Henderson, R.J.; Tocker, D.R.; Ghee, F.M.; Dick, J.R.; Porter, A.; Smullen, R.P.; Legendre, M.; Kerdchuen, N.; Corraze, G. and Bergot P. (1995). Larval rearing of African catfish, *Heterobranchus*

longifilus (Teleostei, Clariidae): Effect of dietary lipids on growth, survival and fatty acid composition of fry. Aquatic Living Resources, 8:355–363.
33. Bell, G.J.; Mcevoy, J.; Tocher, D.R.; Mcghee, F.; Patrick, J.C. and Sargent, J.R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism. Journal of Nutrition, 131:1535-1543.
34. Bergsson, G.; Hilmarsson, H. and Thormar, H. (2011). Antibacterial, antiviral and antifungal activities of lipids. In: Thormar H. (eds), Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. John Wiley & Sons Limited, Chichester, United Kingdom. pp. 47-80.
35. Bilan, M.I.; vinogradova, E.V.; Shashkov, A.S. and Usov, A.I. (2007). Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the pacific green alga *Codium yezoense*. Carbohydrate Research, 342:586-596.
36. Borgesen F., 1939. Marine algae from the Iranian Gulf specially from the nearmost part near Bushehr and Khark, Part: 1., pp.47-141.
37. Briggs M.R.P. and Funge – Smith, S. J. (1996). The potential use of *Gracilaria sp.* meal diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture Research, 27:345-354.
38. Caldwell G.S.; Bentley M.G. and Olive P.J.W. (2003). The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. Toxicon,;42(3):301-6.
39. Capone, G. D.; Weston, P. D.; Miller, V. and Shoemaker, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. Aquaculture, (145): 55-75.
40. Chan, J. C. C.; Cheung, P. C. and Ang, J. P.O. (1997). Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3056–3059.
41. Chew, Y.L.; Lim, Y.Y.; Omar, M. and Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia LWT. Food Science and Technology., 41(6): 1067-1072.
42. Chiheb, I.; Riadi, H.; Martinez-Lopez, J.; Dominguez, S.J.F.; Gomez, V.J.A.; Bouziane H. and Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. African Journal of Biotechnology, 8: 1258-1262.
43. Chitra, S. (1995). Effect of feeding supplemented stresstol bioencapsulated *Artemia franciscana* on growth and stress tolerance—in Penaeus indicus postlarvae. M.Phil Dissertation, MS University, Tirunelveli.
44. Chotigeat, W., Tongsupa, Supamattaya, S. and Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture, 23-30.
45. Chotigeat, W.; Tongsupa, S.; Supamataya, K. and Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture, 233:23–30.
46. Chouhury, S.; Sree, A.; Mukherjee, S. C.; Pattnik, P. and Bapuji M. (2005). *In Vitro* Antibacterial Activity of Extracts of Selected Marine Algae and Mangroves against Fish Pathogens. *Asian Fisheries Science*,18: 285-294.
47. Chu, W.L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. International e-Journal of Science, Medicine & Education 6(1):24-S37.
48. Citarasu T, Sivaram V, Immanuel G, Rout N, Murugan V (2006) Influence of selected Indian immuno-stimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish Shellfish Immunology, 21:372–384.
49. Citarasu, T.; Babu, M.M.; Punitha, S.M.J.; Venket Ramalingam, K. and Marian, MP. (2001). Control of pathogenic bacteria using herbal biomedicinal products in the larviculture system of *Penaeus monodon*. Inter-national Conference on Advanced Technologies in Fisheries and Marine Sciences, MS University,India.
50. Citarasu, T.; Sekar, R.R.; Babu, M.M. and Marian, M.P. (2002). Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. Asian Fisheries Science, 15:21–32.
51. Citarasu, T.K.; Babu, M.M.; Sekar, R.J.R. and Marian, M.P. (2002). Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in Penaeus monodon , Fabricius. Asian Fish. Sci., 15: 21–32.
52. Citarasu, T.K.; Venkata Malingam, M.M.; Babu, R.; Sekar R.J.R. and Marian, M.P. (2003). Influence of the antibacterial herbs, Solanum trilobatum and Andrographis paniculata on the bacterial load of Penaeus monodon post larvae. Aquaculture International, 11: 583-595.
53. Citrasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture Internatinal,18:403–414.
54. Collins, S. (2001). UWC –Enviro facts http:/www.botany.uwc.ac.za/Envfacts/seaweeds
55. Cox, S.; Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six edible Irish seaweeds. International Food Research Journal,17(1): 205-220.
56. Craige, J.S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agricul-ture. Journal of Applied Phycology**,** 23: 371-393.

57. Cruz-Suarez, Tapia Salazar, M.; Nieto Lopez, M. and Rique, D. (2008). A Review of Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and Co-Culture. Programa of Maricultura, University of Mexico. 304-333pp.
58. Cunningham, S. and Joshi, L. (2010). In: Transgenic Crop Plants; Kole, C. Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, pp. 343-35.
59. Cuzon, G.; Lawrence, A.; Gaxiola, G.; Rosas, C. and Guillame J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture, 235: 513 - 551.
60. Dashtiannasab A.; Kakoolaki S.; Sharif rohani M. and Yeganeh V. 2012. *In vitro* effects of *Sargassum latifolium* (Agardeh, 1948) against selected bacterial pathogens of shrimp. Iranian Journal of Fisheries Sciences 11(**4**) 765-775.
61. Daun, H. (1988). The chemistry of carotenoids and their importance in food. Journal of Clinical Nutrition, 7: 97- 100.
62. Davies DG, Marques CNH (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. Journal of Bacteriology, 191:1393-1403.
63. Davies, A. (2002). Basic introduction to seaweeds, http://www.freakinfucus.co.uk/index.htm. 37.
64. Dawes, R. M. (1980). "Social dilemmas". *Annual Review of Psychology* **31**: 169–193. doi:10.1146/annurev.ps.31.020180.001125
65. Devienne, K.F. and Raddi, M.S.G. (2002). Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. Brazilian Journal of Microbiology, 33: 166-168.
66. Duffy, C. F. and Power, R.F. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Intenational Journal of Antiomicrobial Agents, 17: 527-529.
67. FAO, 2003. A guide to to the seaweed industry. Fao fisheries technical papers No. 441. ISSN 0429-9345. FAO. Rome.
68. Flegel, T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology, 110:166-173.
69. Garcia-Armisen, T.; Vercammen, K.; Passerat, J.; Triest, D.; Servais, P. and Cornelis, P. (2011). Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. Water Research, (45): 788-796.
70. Ghaednia, B.; Mehrabi, M. R.; Mirbakhsh, M.; Yeganeh, V.; Hoseinkhezri, P.; Garibi, G. and Ghaffar, J. A. (2011). Effect of hot water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fennerpenaeus indicus. Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *10*(4), 616-630.
71. Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trend in Food Science & Technol*ogy, *22*: 315-326.
72. Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the applica-tion of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. Innovate Food Science and Emergence Technology,12: 600-609.
73. Harbo, R.M. (1999). Whelks to Whales Coastal Marine Life of the Pacific Northwest. Harbour Publishing, Madeira Park, B.C., Canada
74. Hashim, R. and Mat Saat N. A., 1992 The utilization of seaweed meals as binding agents in
75. Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndeslad, M., (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. Aquaculture, 133:175–84.
76. Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufosse, L.; Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environmental Research 52 (3): 231–247.
77. Herwing, R.P.; Gary, J.P. and Weston, D.P. (1997). Antibiotic resistant bacteria in surfacial sediments near Salmon net cage farms in Puget Sound, Washington. Aquaculture ,14: 263–283.
78. Holdt, S.L. and Kraan ,S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. Journal of Applied Phycology, 23: 543-597.
79. Hornsey, I.S., Hide, D., (1985). The production of antimicrobial compounds by British Marine Algae. IV Variation of antimicrobial activity with algal generation. British Phycology Journal, 20: 21-25.
80. Hornsey, I. and Hide, D. (1974). The production of antimicrobial compounds by British marine algae 1.Antibiotic-Producing marine algae. Br. Phycol. J.,9:353-369.
81. Hou, W.Y. and Chen, J.C. (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 19 (2):127–138.
82. Huang, X.; zhou, H, 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extract on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* . Fish & Shelfish Immunology. 20: 750-7.
83. Hudinaga, M. (1942). Reproduction, development and rearing of *P. japonicus*. Japonies Journal of Zoology, 10(2): 305-393.

84. Huxley, V.A.J. and Lipton, A.P. (2010). Immunomodulatory effect of Sargassum wightii on Penaeus monodon (Fab.). The Asian Journal of Animal Science, 4 (2): 192-196
85. Immanuel, G.; Citarasu, T.; Sivaram, V.; Michael Babu, M. and Palavesam, A. (2007). Delivery of HUFA, probionts and biomedicine through bioencapsulated Artemia as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesity in shrimp Penaeus monodon postlarvae. Aquacult International, 15:137–152.
86. Immanuel, G.; Palavesam, A. and Marian, M. (2001). Effects of feeding lipid enriched Artemia nauplii on survival, growth, fatty acids and stress resistance of post larvae *Penaeus indicus*. Journal of Asian Fisheries Science 4,
87. Immanuel, G.; Vincybai, V.C.; Sivaram, V.; Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp Penaeus indicus juveniles. Aquaculture, 236: 53–65.
88. Immanuel, G.; Vincybai, V.C.; Sivaram, V.; Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236: 53–65.
89. Indu, H. and Seenivasan, R. (2013). *In vitro* Antioxidant activity of selected seaweed from southeast coast of India. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2):474-484.
90. Ismail, A. and Hong, T.S. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. Malasian Journal of Nutral, 8: 167–177.
91. Jayaprakas, V. and Euphrasia, J. (1996). Growth performance of Labeo rohita(Ham.) to Livol (IHF-1000), a herbal product. Process Indian Natural Science Academy Bultin, 63(2):1–10.
92. Jayaprakas, V. and Sambhu, C. (1996). Growth response of white prawn, *Penaeus indicus* to dietary L-carnitine. Asian Fish Science, 9:209–219.
93. Jose, J.J., Lipton, A.P. and Subhash, S.K., 2008. Impact of marine secondary metabolites (MSM) from Hypnea musciformis as an immunostimulant on hemogram count and Vibrio alginolyticus infection in the prawn, Penaeus monodon, at different salinities. Israeel Journal of Aquaculture Biomidcine, 60 (1): 65–69.
94. Kahl, R. and Kappus, H. (1993).Toxicity of synthetic antioxidant BHT and BHA in comparison with natural antioxidant vitamin E. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. 196: 329-338.
95. Kaladharan, P.; Navas, K. A. and Kandan. S. (1998). Seagrass production in Minicoy atoll of Lakshadweep Archipelago. Indian Journal of Fisheries, 45 (1): 79- 83.
96. Kandhasamy, M. and K.D. Arunachalam, (2008). Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. African Journal of Biotechnology, 7: 1958-1961.
97. Kanjana, K.; Radtanatip, T.; Asuvapongpatana, S.; Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed Gracilaria fisheri prevent Vibrio harveyi infections in the black tiger shrimp Penaeus monodon. Fish Shellfish Immunol. 30(1): 389–396.
98. Karunasagar, I.; Pai, R. and Malathi, G.R. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture,128: 203-209.
99. Keyrouz, R.; Abasq, M.L. and Le Bourvellec, C. (2011). Total phenolic con-tents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. Food Chemistry,126*:* 831-836.
100. Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. Journal of Plant Growth Regulation, 28: 386-399.
101. Kuda, T.; Tsunekawa, M.; Hishi, T. and Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of dried kayamo-nori, a brown alga Scytosiphon lomentaria (Scytosiphonales, Phaeophyceae). Food Chemistry, 89: 617-622.
102. Kumar, K. S.; Ganesan, K. and Subba Rao, P. V. (2007). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—an edible seaweed. Food Chemistry,107: 289– 295.
103. Kumar, K. S.; Ganesan, K. and Subba Rao, P.V. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. Food Chemistry, 107: 289–295.
104. Lavilla-Pitogo, CR. (1995). Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In: Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP (eds) Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p 107-121.
105. Lee, Y.K.; Chew, P.F.; Soh, B.S. and Tham, L.Y. (2003). Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguieneis* by feeding *Spirulina platensis* . Journal of Applied Phycology, 15:279–287.
106. Leger, P.; Bengtson, DA.; Simpson, KL. and Sorgeloos P. (1986). The use and nutritional value of Artemia as a food source. Oceanogr. Marine Biology Annual Review, 24: 521-623.
107. Lepage G. and Roy C.C., (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research, 25:1391-1396.
108. Lepage, G. and Roy, C.C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification with out prior extraction or purification. Journal of Lipid Research, 25:1391-1396.

109. Li, Y.X.; Wijesekaraa, I.; Li, Y. and Kima, S.K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. Process Biochemistry,46: 2219-2224.
110. Lightner, D.V. 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. pp. 81-116, *in*: Lee, C.-S, and O'Bryen, P.J. (eds.) Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
111. Lipton, A.P., Pramitha, V.S., Jose, J.J., 2009. Marine secondary metabolites (MSM) from macro algae enhance bacterial clearance in hemolymph of Penaeus monodon. Isr. J. Aquacult-Bamid. 61 (1),42–47.
112. Ma, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Ye, S. and Li, A. (2006). Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. The Science of the Total Environment, (367) 1: 273-277.
113. Mabeau, S. and Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. Trends Food Science and Technology, 4,103–7.
114. MacKinnon, S.A.; Craft, C.A.; Hiltz, D.; Ugarte, R. (2010). Improved methods of analysis for betaines in *Ascophyllum nodosum* and its commercial seaweed extracts. Journal of Applied Phycology ,22: 489-494.
115. Mahasneh, I.; Jamal, M.; Kashashneh, M. and Zibdeh, M. (1995). Antibiotic activity of marine algae against multiantibiotic resistant bacteria. *Microbios*, 83, 23–26.
116. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remes, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79: 727-747.
117. Manilal, A., Selvin, J., Sujith, S., Panikkar, M.V.N., 2012. Evaluation of therapeutic efficacy of Indian green alga, Acrosiphonia orientalis (J. Agardh) in the treatment of vibriosis in *Penaeus monodon*.Thalassas International Journal of Marine Science, 28 (1): 33–46.
118. Manilal, A.; Selvin, . and George, S. (2012). *In vivo* therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatme nt of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. Saudi Journal of Biological Sciences, 19:165–175.
119. Marinho-Soriano, E.; Camara M.R.; Cabral T.M. and Carneiro, M.A.A. (2007) . Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (Litopenaeus vannamei) farming. Aquaclture Research, 38:182 – 187.
120. Matelijan, G. (2006). The world's healthiest foods. http://www,whfoods.org
121. Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi, T.; Yamamoto, Y.; Niki, E. and Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. Journal of Applied Phycology, 9: 29–35.
122. Matyar, F.; Kaya, A. and Dinçer, S. (2008). Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment, (407): 279-285.
123. Mayalen, Z.; Daniel, R. and Yolanda, F.P. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. Journal of Applied Phycology, 19: 449–458.
124. Michael Babu, M.; Sivaram, V.; Immanuel, G.; Citarasu, T. and Punitha, S.M.J. (2008). Effects of Herbal Enriched Artemia Supplementation over the Reproductive Performance and Larval Quality in Spent Spawners of the Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,8: 301-307.
125. Mohammadi M.; Tajik H. and Hajeb P. (2013). Nutritional composition of seaweeds from the Northern Persian Gulf. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(1): 232- 240.
126. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal Science Technology,;26 (2):211-219.
127. Mtolera, M.S.P. and Semesi, A.K. (1996). Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania. Current Trends Marine Botanical Research of African Region, P:211-217.
128. Multidrug Resistant Human Pathogen Acinetobacter baumannii and Fish Pathogens. World Journal of Fish and Marine Sciences, 3(1): 51-57.
129. NACA, 2012. Asia Pacific Emergency Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) /Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). NACA, Bangkok,Thailand.
130. Nash, G.; Nithimathahoke, C.;Tungmandi, C.; Arkarjamon, A. and Rumathaversub, P. (1992). Vibriosis and its control in pond reared *P. monodon* in Thailand. *In*: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries So-ciety, Manila p: 71-80.
131. Paez-Osuna, F.; Gracia, A.; Flores-Verdugo, F.; Lyle-Fritch, L. P.; Alonso-Rodriguez, R.; Roque, A. and Ruiz-Fernandez, A. C. (2003). Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. Marine Pollution Bulletin, (46) 7: 806-815.

132. Paula, E.J.; Pereira, R.T.L. and Ohno, M. (2002). Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil. Phycol Research, 50:1–9.
133. pelleted feeds for snakehead (*Charma striatus*) fry and their effects on growth. Aquaculture 108:299-308
134. Penaflorida V. D. and Golez N. V. (1996). Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 143:393-401.
135. Pesando, D. and B. Caram, 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean Coast for antibacterial and antifungal activity. Botanica Marina, 27: 381-86.
136. Plaza, M.; Santoyo, S. and Jaime, L. (2010). Screening for bioactive com-pounds from alga. Journal of Pharmaceutical and Biomedicine Analysis,51:450-455.
137. Primavera, J.H.; Lavilla-Pitogo, C.R.; Ladja, J.M. and Dela Pena, M.R., (1993). A survey of chemicals and biological products used in intensive shrimp farms in the Philippines. Marine Pollution Bulletin, 26: 35–40.
138. Pulz, O. and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology Biotechnology, 65: 635-648.
139. Pushparaj, A.; Raubbin R.S. and Balasankar T. (2014). Antibacterial activity of Kappaphycus alvarezii and Ulva lactuca extracts against human pathogenic bacteria. International Journal Current Microbiology Applied Science, 3(1): 432-436.
140. Rahim, Z.; Sanyal, S.C.; Aziz, K.M.S.; Huz, M.I. and Chowdhury, A.A., (1998). Isolation of enterotoxigenic, haemolytic and antibiotic resistant Aermonas hydrophila strains from infected fish in Bangladesh. Applied Environmental Microbiology, 48: 865– 867.
141. Rajauria, G.; Jaiswal, A.K.; Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Brown Seaweed Himanthalia Elongata from Western Coast of Ireland. Journal of Food Biochemistry. (DOI:10.1111/ j.1745-4514.2012.00663.x)
142. Ramos S.C.S.; Oliveira J.C.S.; Camara C.A.G.; Castelar, I.; Carvalho, A.F.F.U. and Lima-Filho J.V. (2009). Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. Rev. Bras. Farmacogn;19:376-81.
143. Rao, P.S. and Parekh, K.S. (1981). Antibacterial activity of Indian Seaweed Extracts. Botanica Marina, 24: 577-589.
144. Rao, P.S.; Girijavallaban, K.G.; Muthasarny,S.; Chandrica, V.; Gopinathan,C.P.;Kalimuthu,S. and Najmoddin, M. (1991). Bioactivity in marine algae. In:Bioactive compounds from marine organisms with emphasis on the India ocean: An Indo-United State symposium. Oxford and IBH pub. Co., New Delhi, ISBN-10:(8120405749), p 373-377.
145. Rashmi, C.; Vinayak, A.; Sabu, S. and Chatterji, A. (2011). Bi o-Prospecting of a Few Brown Seaweeds for Their Cytotoxic and Antioxidant Activities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 24:1-9.
146. Rastian, Z.; Mehranian, M.; Vahabzadeh, F. and Sartavi K. (2007). Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. African Journal of Biotechnology6 (24): 2740-2745.
147. Reichelt, J.L. and Borowitzka, M.A. (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large scale screening programme. Hydrobiology, 116/117: 158-168.
148. Rengpipat, S.; Tunyanun, A.; Fast, A.W.; Piyatiratitivorakul S. and Menasveta, P. (2003). Enhanced growth and resistance to Vibrio challenge in pondreared Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed a Bacillus probiotic. Disease Aquatic Organisms,55:169-173.
149. Rizvi, MA.; Valeem, E.E. and Shameel M. (2011).Bioactivity, elementology and fatty acid composition of Jolyna laminarioides Guimaraes from a rocky ledge of Karachi, Pakistan. International Journal of Phycology and Phycochemistry, 7(2): 153-162.
150. Ruangpan, L.; Tabkaew, R.; Yoshida, T.; Kawatsu, H. and Saitanu, K. (1995). Numerical taxonomy of Vibrio spp. isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Thailand. In : Shariff, M. Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (eds) Fish Health Section, Asian Fisheries So-ciety, Manila p 131-140.
151. Ruangsri, J.; Wannades, M.; Wanlem, S.; Songnui, A.; Arunrat, S.; Tanmark, N.; Pecharat, J. and Supamattaya, K. (2004). Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Songklanakarin Journal Science Technology, 26 (1): 43-54.
152. Sachindra, N.M.; Sato, E.; Maeda, H.; Hosokawa, M.; Niwano, Y.; Kohno, M. and Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. Journal of Agriculture Food Chemistry, 55: 8516–8522.
153. Salvador, N.; Gomez-Garreta, A.; Lavelli, L. and Ribera, L. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. Science of Marine, 71: 101-113.

154. Samuelsen, O.B. (1992). The fate of antibiotics/chemotherapeutants in marine aquaculture sediments. In: Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Michel, C. and Alderman, D.J. (Ed), pp. 87-95, Office International des Epizooties, Paris, France.
155. Sanchez Campos, L.N.; Herrera, F.D.; Araujo, A.D.R.; Sanchez, R.A.G.; Partida, M.L.L.; Ruiz, M.D.A. and Navarro, A.F.L. (2014). *Litopenaeus vannamei* immunestimulated with *Macrocystis pyrifera* extract: improving the immune response against *Vibrio campbellii*. Journal of Coastal Life Medicine, 2(8): 617-624.
156. Sastry, V.M.S. and Rao, G.R.K. (1994). Antibacterial substances from marine algae: Successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marine, 37: 357-360.
157. seaweed *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilaria-les): A potential resource for biotechnological purposes? New Bio-technology Journal, 29 (3), 443-450.
158. Selvin, J.; Huxley, A.J. and Lipton , A.P. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. Aquaculture 230 ,241–248.
159. Selvin, J.; Ninawe, A.S. and Lipton, A.P. (2009). Shrimp Disease Management: Prospective Approaches. ANE Publishers, New Delhi, India.
160. Selvin, J.;Manilal, A.; Sujith, S.; Kiran, G.S. and Lipton, A.P. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. Latin American Journal of Aquaculture Research, 39 (2):197–204.
161. Shangliang, T. (1990). The antibacterial and antiviral activity of herbal extracts for fish pathogens. Journal of Ocean University of Qingdao 2:53–60.
162. Sivakumar, K. and Kannappan, S. (2013). Inhibitory effect of marine algae collected from the East and West coast of India against luciferase and luminescence producing *Vibrio harveyi*. African Journal of Biotechnology, 12(22):3493- 3502.
163. Sivakumar, K.; Kannappan, S.; Dineshkumar, M. and Patil, P.K. (2014).Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during Penaeus monodon larviculture. African Journal of Microbiology Research, 8(6):458-469
164. Smith, A. (1992). Farming edible seaweeds in the Caribbean.Appl Phycol Forum., 9: 1–2.
165. Song, Y.L. and Sung, H.H. (1993). Vibriosis resistance in tiger shrimp (*P. monodon)* induced by M. glucon treatment. From discovery to commercialization. European Aquaculture Society, 9, 97 Oostende, Belgium, pp:86-97.
166. Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Leger, P.; Tackaert, W. and Versichele D. (1986). Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture. State Univer sity of Ghent, Gent, Belgium. 196P.
167. Stirk, W.A.; Van Staden, J. (1997). Isolation and identification of cyto-kinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus ser-ratus* L. Journal of Applied Phycology, 9: 327-330.
168. Stolker, A. A. M. and Brinkman, U.A. Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. Journal of Chromatography A, (1067):15-53.
169. Stolker, A. A.M. and Brinkman, U.A. Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. Journal of Chromatography,1067: 15-53.
170. Suarez-Garcia, H.A. (2006). Effect of alginate and two seaweeds *sargassum sp.* and *Macrocystis pyrifera* as binder in shrimp Litopenaeus vannamei pellet mill. Aquculture Nutrition, 8(4): 418-426.
171. Sung, H.H. and Song, Y.L. (1996). Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 45(1): 41-54.
172. Taskin, E.; Ozturk M. and Kurt, O. (2001). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African Journal of Biotechnology, 6: 2746-2751.
173. Tierney, J. E.; Russell, J. M.; Eggermont, H.E.; Hopmans, C.; Verschuren, D. and Damate, J. S. (2010). Environmental controls on branched tetraether lipid distributions in tropical East African lake sediments. Geochimica et Cos-mochimica Acta, 74:4902–4918.
174. Tran, L.; Nunan, L.; Redman, R M.; Mohney, L L.; Pantoja, C R.; Fitzsimmons, K. and Lightner, D V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 105: 45–55.
175. Tsoumas, J.V.; Alderman, D.J. and Rodgers, C.J. (1989). Aeromonas salmonicida, development of resistance to 4- quinolone antimicrobials. Journal of Fish Diseases, 12: 493–507.
176. Tuney, I.; Cadirci, B.H. Unal D. and Sukatar, A. (2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). Turkish Journal of Biology, 30: 1-5.
177. Turner, N.J. (2003). The ethnobotany of edible seaweed porphyra and its use by the first nations of Pacific Cannada.Cannada Journal of Botany., 81:283-293.

178. Unnikrishnan, G. (1995). Effect of Livol on growth, food utilization and body composition of the Indian major carp, Catla catla (Ham.). M.Sc. Dissertation, University of Kerala, India, p 34.
179. Velmurgan, S. and Citrasu, T. (2010). Effect of Herbal Antibacterial Extracts on the Gut Floral Changes in Indian White Shrimp Fenneropenaeus indicus. Romanian Biotechnological Letters, 15(6):5709-5717.
180. Vlachos, V.; Critchley A.T. and Holy A. V. (1997). Antimicrobial activity of extracts from selected Southern African marine macroalgae. Southern African Journal of Science,93: 328-32.
181. Watanabe, F.; Takenaka, S.; Katsura, H.; Masumder, S.A.; Abe, K.; Tamura ,Y. and Nakano, Y. (1999). Dried green and purple lavers (Nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B(12) but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. Journal of Agriculture Food Chemistry, 47(6):2341-3
182. Webb Ginger, (1997). Medicine from the sea- medicinal qualities of seaplants.The Herbalist".Vegetarian times.,April.http://www.findarticles.com.
183. Wong H.K. and Cheung, K.C.P. (2000). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part I. Proximate composition, amino acid profiles and some physico - chemical properties. Food Chemistr y, 71: 475 - 482.
184. Yeh, R.Y.; Shiu, Y.L.; Shei, S.C.; Cheng, S.C.; Huang, S.Y.; Lin, J.C. and Liu, C.H. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 27:26–32.
185. Yeh, S. T.; Lee, C. S. and Chen, J. C. (2006). Administrasion of Hot Water Extract of Brown Seaweed *Sargassum duplicatum* via Immersion and Injection Enhances The Immune Resistence of White Shrimp *Litopenaeus vannamei.* Fish & Shelfish Immunology, 20: 332-345.
186. Young-Joo, L.; Adlercreutz, H. and Kwon, H.J. (2006). Quantitative Analysis of Isoflavones and Lignans in Sea Vegetables Consumed in Korea Using Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Food Science and Biotechnology., 15, 1;102-106.
187. Youngsblood, W.W.; Blumer, M.; Guillard R.R.L. and Flore, F. (1971). Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. Marine Biology,8: 190-201.
188. Yuan, Y. V.; Carrington, M. F. and Walsh, N. A. (2005). Extracts from dulse *(Palmaria palmata)* are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. Food and Chemical Toxicology, 43(7): 1073–1081.
189. Yuvaraj, N.; Kanmani, P.; Satishkumar, R.; Paari, K.A.; Pattukumar, V. and Arul, V. (2011). Extraction, Purification and Partial Characterization of Cladophora glomerata Against.
190. Zandi, K.; Salimi, M. and Sartavi, K. (2007). *In vitro* Antiviral activity of Red Marine Alga from Persian Gulf, *Gracilaria slicornia*, against herpes simplex virus type 2. Journal of Biology Science,7: 1274-1277.
191. Zandi, K.; Salimi, M. and Sartavi, K. (2007). *In vitro* Antiviral activity of Red Marine Alga from Persian Gulf, *Gracilaria slicornia*, against herpes simplex virus type 2. Journal of Biology Science,7: 1274-1277.
192. Zhou, K. and YU, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm.Wiss. Technology, 37: 717–721.

Abstract

The use of antibiotics in aquaculture has been limited. Scientifics seeking for natural substitutes to prevent of aquatic animals diseases. Considering seaweeds are rich of nutritions and bioactive compounds, the propose of this study is: investigation the potential and use possibility of native seaweeds from Persian Gulf in shrimp aquculture industry to improve growth, survival of postlarvae and to resistance against pathogens such as vibriosis. For this propose 7 macroalgaes species from Bushehr province coast, inclouding: green algae (*C.iyengarii*), brown algae (*S.angutifolium* and *S.ilicifolium*) and red algae (*L.snyderiae*, *K.alvarezii* and *G.corticata*) were collected and identified. Then seaweed extracts abtained by Water, Ethanol, Methanol and Chloroform solvents by soaking method. *In vitro* antibacterial activity of extracts against Gr^+ bacteria (*S.aureus* and *B.subtilis*) and Gr^- bacteria (*V.harveyi*,*V.alginolyticus* and *E.coli*) was conducted by Agar diffusion, MIC and MBC methods. Antioxidant activity also by DPPH and EC_{50} methods was investigated. According to results of these two tests four seaweeds species (*S.angutifolium*, *L.snyderiae*, *K.alvarezii* and *G.corticata*) were selected for use in shrimp postlarvae (PL_{22}) diets by Bio-Encapsulation (*Artemia* enrichment). Before of enrichment, toxicity effect of extracts to *Artemia* naplii were evaluated by determination of LC_{50} 24 h method. From results of this section Ethanol extracts were selected to bioencapsulation. After encapsulation shrimp postlarvae divided to 12 groups in triplicate, namely: C^-, C^+, S (200), S (400), S (600), L(200), L(400), L(600), G(300), G(600), K(300) and K(600). During 30 days of reared period C^- and C^+ use of basal diet and unenriched *Artemia*, but the other groups use of basal diet and enriched *Artemia*. Except C^-, the shrimps in first day of culture put in 10^7 cfu/ml v.harveyi suspension for 30 minutes, and after water exchange 10 ml of this dose was added to reared aquaria. After 30 days survival percentage, obtained weight and SGR% were investigated. To evaluate vibrio loadind, every 10 days 5 postlarvae were sampled randomly for vibrio count. Results showed that vibrio count in C^- was less than the others and in C^+ was more than the others. In treatments vibrio count in L(200) was the most and L(600) was the less. Survival rate in C^- was the most and after that G(600) with 79.4±6.6% and then S(300) and K(600) were 73.3±7.3% and 70.6±6.6% respectively that were significantly compare the other ($P < 0.01$). Also the C^+ was the less with 33.3±6.6% that difference was significant ($P< 0.01$). In this study growth parameters of all groups that fed by enriched *Artemia* were better than C^+ ($P<0.05$). After cultre period 10 shrimp of every aquarium disinfected and reared for 10 days like before treatment. After 10 days the shrimps were challenged by 3×10^8 cfu/ml *V.harveyi* and mortality was recorded for 7 days. The all of animals in C^- were survive but more than 90% of C^+ were dead. And survival in all of treatments were better the C^+ ($P<0.05$). the study showed the ethanol extracts of selsected seaweed from Persian Gulf is a good source for growth, Survival and disease control in shrimp larviculture.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center

---

Project Title : Investigation on possibility of survival and growth enhancing by selected seaweeds from Persian Gulf in post larvae shrimp *Litopenaeus vannamei*
Approved Number: 4-80-12-89105
Author: Aghil Dashtiannasab
Project Researcher : Aghil Dashtiannasab
Collaborator(s) *:* M. Sharif Rohani; B. Ghaednia; M. Mirbakhsh; V. Yeganeh; I. Keshtkar; M.A. Nazzari ; M. Afsharnasab; A.A. Zendehbodi; M. Khalilpazir, Gh.Dalirpor, A. Asadi, M. Sabohi
Advisor(s): -
Supervisor: M.R. Mehrabi
Location of execution : Bushehr province
Date of Beginning : 2010
Period of execution : 2 Years
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Shrimp Research Center

Project Title :

Investigation on possibility of survival and growth enhancing by selected seaweeds from Persian Gulf in post larvae shrimp *Litopenaeus vannamei*

Project Researcher :

Aghil Dashtiannasab

Register NO.

48731