پرورش در قفس

کاربرد جلبک کلرلا ولگاریس(*Chlorella vulgaris*) به عنوان وکتور بیولوژیک واکسن خوراکی بیماری ویبریوزیس (دمل قرمز) در هامورماهیان پرورش یافته در سیستم های پرورش در قفس

افشین پیری علم[۱]،سید علی اکبر هدایتی[۲]، سهیلا رستگاری[۲]، آرمین پیری علم[۳]

۱-گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۲-گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی دانشگاه گرگان

۳-گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد خرم آباد

www.afshinpirialam@ut.ac.ir

مقدمه پرورش در قفس یکی از روش‌های متداول در پرورش ماهی است که در سال‌های اخیر با توجه به مزایای خاص خود، مورد توجه اکثر کشورهای دنیا واقع گردیده است. اولین ماهی دریایی که به شیوه پرورش در قفس در ایران تکثیر شد ماهی هامور است. هامورماهیان از جمله اقتصادی ترین و ارزشمندترین ماهیان خلیج فارس و دریای عمان به شمار می روند که به دلیل دارا بودن طعم مطلوب، مورد صید بی رویه قرار گرفته و در خطر انقراض می باشند. مراحل پرورش این ماهی شامل دو مرحلهٔ نوزادگاهی و پس از آن می باشد و لاروهای این ماهی در دوران ابتدایی خود از جلبک کلرلا تغذیه می نمایند. جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) نوعی جلبک شدیداً فتوسنتز کننده بوده که به دلیل دارا بودن غشاء نفوذپذیر و دیوارهٔ سلولی نازک تا حدود۸۲٪ جذب دارد و می تواند سموم و مواد مختلف را به خوبی جذب نموده و ذخیره نماید. بیماری ویبریوزیس نوعی بیماری خطرناک در هامورماهیان به شمار رفته که تهدیدی برای صنعت پرورش در قفس محسوب می شود و در هامورماهیان منجر به بروز بیماری دمل قرمز Red Boil Disease می شود. این بیماری توسط گونه های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *ویبریو انگوئیلاروم و ویبریو ولنیفیکوس* به وجود می آید. بیماری دمل قرمز، تمامی رده های سنی هامورماهیان (نوزادان، انگشت قدها، جوان ها و مولدین) را تحت تاثیر قرار می دهد. با توجه به توضیحات قبلی می توان با غوطه ور نمودن جلبک های کلرلا در سوپانسیون حاوی باکتری های بیماری زای کشته شدهٔ متعلق به جنس ویبریو، این جلبک ها به خوبی باکتری ها را جذب نموده و پس از انجام مراحل غنی سازی، وکتورهای زیستی حاصله را در اختیار لاروهای هامور(۵ تا ۲۵گرم) قرار داده و پس از

تحریک سیستم ایمنی لاروها، ایمنی اکتسابی لاروها به وجود آمده و در مراحل بعدی زندگی خود دیگر درگیر این بیماری خطرناک نمی شوند. در کشور ما تا کنون در این زمینه، هیچ اقدامی صورت نگرفته است.

کلمات کلیدی

کلرلا، هامورماهیان، پرورش در قفس، ویبریوزیس

مواد و روش کار

مکان انجام تحقیق

مکان انجام طرح پیشنهادی، سواحل خلیج فارس و دریای عمان می باشند که در سالهای اخیر افزایش تقاضا برای ماهیانی نظیر صبیتی، هامور ماهیان و نیز سود بالای پرورش این ماهیان نظر سرمایه گذاران ایران را به این صنعت جلب کرده است و سرمایه گذاری های جدید برای پرورش ماهیان فوق در سواحل بوشهر و قشم رو به افزایش می باشد.

کشت انبوه

جلبک کلرلا

پس از ساخت محیط کشت(Tang Kang Marine Research Lab)(TMRL)(AG) ، که ترکیبی از املاح معدنی و ازت به عنوان منبع نیتروژن می باشد: شامل ۱ گرم ($Fecl_3$ ، ۵ گرم NaH_2Po_4، و ۵۰ گرم ازت ،۱۰سی سی استوک خالص شـدهٔ میکروجلبک سبز Chlorella sp به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی تزریق شده و در یک اطاق کشت استریل با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس و با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس و پریود نوری یا دوره روشنایی (L) و تاریکی (D) توسط تایمر اتوماتیک به صورت تناوب (۱۲/۱۲):(L/D) ساعت تنظیم می گردد(گنجیان،۱۳۸۹). هوادهی ارلن ۲۰ سی سی حاوی میکروجلبک موجود در محیط کشت TMRL)AG) در هر میز با استفاده از پمپ هوا آکواریوم انجام می شود.

تهیه نمودن واکسن خوراکی ویبریوزیس پیشنهادی

بعد از کشت انبوه باکتری و تهیه رسوب سلولی، استخراج LPS به روش فنل داغ اصلاح شده انجام می گردد و با استفاده از فنل، حرارت و سانتریفیوژ، فاز آبی استخراج و با افزودن ۲/۱ حجم اتانول سرد و TCA، محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به مدت ۲۴ ساعت دیالیز و LPS با سه برابر حجم اتانول رسوب داده شد. الکتروفورز LPS در ژل پلی آکریل آمید در حضور SDS انجام شد و پس از اتمام الکتروفورز ژل جدا و رنگ آمیزی با نیترات نقره انجام می گردد. جهت دتوکسیفای، LPS در حداقل مقدار NaoH حل و بعد از حرارت در ۱۰۰ درجه به مدت دو روز دیالیز شد. در روش فنل داغ اصلاح شده با مشاهده سه فاز آبی، فنلی و رسوب، فاز آبی به دلیل وجود LPSویبریو در این فاز مدنظر بوده و پس از افزودن اتانول، TCA و انجام دیالیز، هاله شفافی بعد از افزودن سه برابر حجم

اتانول مشاهده شد که با سانتریفیوژ LPS جدا می گردد. استخراج به روش LAL جهت آزمایش پیروژنی و توکسیسیته، تست و عدم تب زایی و عدم سمیت آن مورد تایید قرار می گیرد. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان دهنده تشکیل باندهای سالم LPS در رنگ آمیزی نیترات نقره به عمل آمده خواهد بود و آزمون توکسیسیته حاکی از عدم سمیت LPS؛در نتیجه استفاده از این آنتی ژن به عنوان واکسن علیه عفونت های ویبریویی را امکان پذیر می سازد.

غنی سازی جلبک ها با واکسن پیشنهادی

دیواره سلولی بسیار نازکی داشته و غشای این جلبک نیز خاصیت نفوذپذیری بالایی دارد(تا۸۲٪). سلول های کشته شدهٔ باکتری ویبریو را با کمک پوششی کربنی یا فسفاته به مخزن حاوی جلبک وارد نموده و جلبک نیز به راحتی ترکیب پیشنهادی را جذب نموده و در واکوئل خود که محل تجمع ترکیبات نشاسته ای و فسفاته می باشد، ذخیره می نماید.

تغذیهٔ لاروها با جلبک کلرلا

ظروف حاوی محلول آب سبز (سرشار از جلبک کلرلا) را در مخزن حاوی لاروهای هامورماهیان (۵تا۲۵گرمی) موجود در نوزادگاه، تخلیه نموده و لاروها به تغذیه از جلبک ها پرداخته و امید است درصد تحویل دارو به دستگاه گوارش با کمک این روش کم هزینه بین ۳۰ تا ۵۰ ٪ باشد.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به روش پیشنهادی، پس از عبور جلبک های حاوی سلول های کشته شدهٔ ویبریو از معدهٔ ابتدایی لاروها و رسیدن به رودهٔ لاروها، پس از تجزیهٔ دیوارهٔ سلولی جلبک، سلول های کشته شدهٔ ویبریو وارد بدن لارو شده و پاسخ ایمنی مورد انتظار را به وجود بیاورند و پس از انتقال به سیستم های دریایی و در معرض گیری احتمالی با باکتری های خانوادهٔ ویبریوناسه، ایمنی حاصله منجر به کاهش تلفات و خسارات اقتصادی به این صنعت نوپا و ارزشمند گردد. شایان به ذکر است از این متد می توان برای سایر گونه های باارزش تجاری بالا و با جلبک های آب شور نیز استفاده نمود.