تاثیر تغذیه با مخمر تحریک شده حاوی پروتئین‌های شوک حرارتیHSP بر میزان رشد، بقاء و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در دو گونه *Artemia urmiana* و *Artemia franciscana*

- **گودرز جعفری**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ٥١٨١٨-٥٧٥٦١
- **رامین مناف‌فر***: گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ٥١٨١٨-٥٧٥٦١
- **صمد زارع**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ٥١٨١٨-٥٧٥٦١

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٢ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٢

چکیده

افزایش بیوتکنولوژیک رشد، بقاء و مقاومت آبزیان در برابر استرس‌های محیطی، خصوصاً در دوران لاروی، از جمله موضوعات تحقیقاتی مهم می‌باشد. افزایش سطح پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) یکی از این روش‌هاست زیرا می‌تواند جایگزین مناسبی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها باشد. در طی این تحقیق سعی شد تاثیر تغذیه آرتمیا با پروتئین‌های شوک حرارتی تحریک شده در مخمرهای تک‌سلولی و مقاومت آن در مقابل شرایط نامساعد محیطی بررسی شود. بدین منظور ابتدا مخمر تک‌سلولی در برابر استرس‌های محیطی شامل شوری و دمای بالا کشت داده شد. پس از اطمینان از افزایش سطح پروتین‌های شوک حرارتی مخمر توسط روش SDS-Page هر دو گونه مختلف آرتمیا با جیره‌های غذایی شامل مخمرهای تحریک شده و جلبک تک‌سلولی *Dunaliella tertiolecta* کشت داده شدند. ٢٠ روز پرورش آرتمیا در تغذیه با این جیره غذایی در کنار تیمار شاهد نشان داد که تغذیه با پروتئین‌های شوک حرارتی می‌تواند بر میزان رشد آرتمیا به‌شدت تاثیر مثبت گذاشته و حتی آن‌را در برابر استرس‌های محیطی سخت مانند شوری ٢٥٠ گرم در لیتر و دمای ٣٤ درجه سانتی‌گراد مقاوم نماید ($p<0/05$).

کلمات کلیدی: آرتمیا، استرس، پروتئین‌های شوک حرارتی، رشد و بقاء، مخمر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Raminmanaffar@yahoo.com

مقدمه

پرورش آبزیان به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود استفاده مداوم و طولانی‌مدت داروهای‌ضدمیکروبی به‌تدریج باعث ایجادسویه‌های مقاوم عوامل بیماری‌زا نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد شد (Balcazar، ۲۰۰۳). در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین روش‌های درمان آنتی‌بیوتیکی مطرح گردیده و به‌نظر می‌رسد استفاده از آن‌ها می‌تواند بسیاری از مشکلات ناشی از درمان و یا کنترل بیماری را مرتفع سازد. امروزه پروبیوتیک‌ها نه تنها به‌عنوان محرک رشد، بلکه برای تحریک سیستم ایمنی بدن و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی به‌کارگرفته می‌شوند (کریم زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

یک راه دیگر با رعایت ایمنی زیستی جهت تقویت سیستم ایمنی موجودات از درون می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که درصورت اعمال استرس، دسته‌ای از پروتئین‌های شوک حرارتی در بدن موجودات یوکاریوت ترشح می‌شود که می‌تواند باعث بالا رفتن مقاومت به استرس‌های محیطی شود. تحقیقات نشان داده است که پروتئین‌ها از طریق ساختمان سه بعدیشان (یعنی ساختمان طبیعی) عمل می‌کند. این ساختمان تا درجه زیادی توسط پیوندهای هیدروژنی نسبتاً ضعیف حفظ می‌شود. این پیوندها می‌توانند توسط بسیاری از استرسورهای محیطی (حرارت، اسمولاریته، سموم، هیپوکسی و غیره) شکسته شوند. زمانی‌که استرس فیزیکوشیمیایی در سطح نامطلوب وجود داشته باشند منجر به دناتوره شدن ساختمان سوم می‌گردند. این حالت، منجر به از دست دادن عملکرد پروتئین و در نتیجه خاتمه عملکردهای بیولوژیکی می‌شود (Somero، ۱۹۹۵). دناتوره شدن پروتئین‌ها موجب می‌شود تا نواحی که به‌طور طبیعی در پروتئین توسط ساختمان سوم حفاظت می‌شوند، بی‌حفاظ گردند. این نواحی بی‌حفاظ می‌توانند به نواحی مشابه در پروتئین‌های دناتوره شده دیگر متصل شده و منجر به تجمع پروتئین‌شوندکه دربدترین حالت منجر به شرایط سیتوتوکسیک می‌شود و در بهترین حالت ذخیره پروتئینی عملکردی داخل سلول به خطر می‌افتد (Feder و Hofmann، ۱۹۹۹). این کار توسط گروهی از پروتئین‌ها که پروتئین‌های شوک یا معمولاً پروتئین‌های شوک حرارتی نامیده می‌شوند، انجام می‌گردد (Feder و Hofmann، ۱۹۹۹). به‌علت کشف این گروه از پروتئین‌ها در طول تحقیقات اولیه‌ای که از طریق شوک حرارتی بیان شدند، به‌نام پروتئین‌های شوک حرارتی نام‌گذاری گردیدند (Lindquist، ۱۹۹۳). به‌هرحال در طول ده سال گذشته بیش‌تر تحقیقات نشان داده است که پروتئین‌های شوک حرارتی در پاسخ به حدود وسیعی از اختلالات یا استرسورهای فیزیولوژیکی (شامل تغییرات در دما، اسموتیک، اکسیژن، pH و سطوح مواد شیمیایی) القاء یا تنظیم افزایشی می‌شوند (Prohaszka و Fust، ۲۰۰۴; Feder و Hofmann، ۱۹۹۹).

فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی داخل سلولی مختلف منجر به بیان HSP می‌شود. تمام استرس‌های شناخته شده اگر به‌اندازه کافی شدید باشند منجر به بیان HSP می‌شوند. بنابراین **HSPs** پروتئین‌های استرسی و بیان آن‌ها پاسخ استرسی نامیده شد. وجه مشترک این استرس‌ها این است که آن‌ها منجر به تشکیل پروتئین‌های دارای اشکال غیرطبیعی می‌شوند (Somero، ۱۹۹۵) که با عملکرد **HSPs** به‌صورت چاپرون‌های مولکولی موافق است. تحقیقات سال‌های اخیر نشان داده است که می‌توان به‌صورت مصنوعی با تحریک پروتئین‌های شوک حرارتی باعث تقویت سیستم دفاعی موجود در برابر استرس‌های محیط شد (Saravanakumar و Soundarapandian، ۲۰۰۹).

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی میزان استرس درجانداران درنظر گرفته می‌شوند (Iwama و همکاران، ۱۹۹۸؛ Sanders، ۱۹۹۵). این پروتئین‌های تنظیم‌کننده درون‌سلولی هم در سلول‌های پروکاریوت و هم در سلول‌های یوکاریوت شناسایی شده‌اند (Lindquist و Craig، ۱۹۹۸). در شرایطی که سلول تحت تأثیر استرس قرار می‌گیرد این پروتئین‌ها ترشح می‌شوند و باعث مقاومت سلول در برابر استرس می‌شود(Baruah و همکاران، ۲۰۱۲). یکی از مهم‌ترین سلول‌های یوکاریوتی که وجود پروتئین‌های شوک حرارتی در آن اثبات شده است مخمر تک‌سلولی به‌نام *Saccharomyces cerevisiae* می‌باشد (واکر، ۱۳۹۱). مهم‌ترین فاکتورهای فیزیکی برای رشد مخمر دما و شوری می‌باشد به‌طوری‌که بهترین دما برای رشد مخمر بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای‌اپتیمم آن ۲۶درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در *S. cerevisiae* دمای بالای قابل تحمل بین ۳۷ تا ۴۳ درجه سانتی‌گراد است که دراین دما همه پروتئین‌های شوک حرارتی بیان می‌شوند. *S. cerevisiae* یک گونه از مخمرهای non-osmoregulator می‌باشد که در پتانسیل آبی ۱/۵- رشد می‌کند که محدوده‌ای به‌اندازه ۰/۹ مولارو تقریباً معادل باغلظت سرم فیزیولوژی می‌باشد تحقیقات نشان داده هست. هنگامی‌که مخمر تحت استرس شوری نیز قرار می‌گیرد پروتئین‌های شوک

حرارتی آن تحریک می‌شوند. مهم‌ترین پروتئین‌های شوک حرارتی که در مخمر شناسایی شده است عبارتند از HSP 12-26-30-60-70-84-104 که از بین آن‌ها HSP60 به‌عنوان یکی از پروتئین‌های چاپرونی باعث جلوگیری از تجمع پروتئین و انباشته شدن پروتئین‌های غیرعادی می‌شود (واکر، ۱۳۹۱). در تحقیق حاضر سعی شد امکان تغذیه آرتمیا با پروتئین‌های شوک حرارتی مخمر و امکان افزایش مقاومت آن را نسبت به استرس‌های محیطی شایع همانند دمای بالا و شوری بررسی نمود. هدف از این کار افزایش مقاومت آرتمیا نسبت به استرس‌های آنی و مهم محیطی و افزایش میزان بقاء آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بخش اول :تولید مخمرتحریک شده HSP: این تحقیق در سال تابستان و پاییز سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه انجام گردید. تحقیق با پرورش مخمر به روش ذیل آغاز شد. ابتدا در یک ارلن به میزان ۷۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه گردید و مواد Glucose 5% (۳۵ گرم)، Yeast Extract 2% (۱۴ گرم)، و K2HPO4 1% (۷ گرم) به آن اضافه شد. هم‌چنین pH آن را با استفاده از اسیداستیک به ۶ رسانده و به‌مدت ۱۵دقیقه و دمای ۱۲۱درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو قرارداده شد بعد از مدت گذرانده شده و خنک شدن ، ۱ گرم مخمر نانوائی *S. cerevisiae* به آن اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در شیکر قرار داده شد، بعد از مدت گذرانده شده، آن‌را در دور ۳۵۰۰ و مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ کرده و مخمر باقی مانده را دو بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند (Aoki و همکاران، ۲۰۰۲). بعد از کشت اولیه، نمونه‌های مخمر ابتدا به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار و در داخل سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. پس از جدا نمودن سلول‌های مخمر از سرم فیزیولوژی با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ در مدت ۱۰دقیقه مخمر فوق در تیمارهای دمایی و شوری مختلف تحت استرس قرار گرفت. بدین منظور ۰/۴ گرم مخمر تر به‌درون فالکن تیوب‌های ۱۵ میلی‌لیتری انتقال و تحت استرس‌های هم‌زمان شوری‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار دماهای ۳۰، ۳۵ و۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مدت ۴ ساعت انکوباسیون ۳ تکرار از هر تیمار ذیل هر نیم ساعت توسط شیکی به آرامی نمونه‌ها تکان داده شدند. پس از این مرحله محتویات لوله‌ها با سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی شده و آماده استخراج پروتئین گردیدند.

جدول ۱: تیمارهای‌استرس‌شوری‌و دما در مخمرهای تک‌سلولی

	دمای ۳۰ درجه	دمای ۳۵ درجه	دمای ۴۰ درجه
سرم فیزیولوژیکی (۰.۹٪)	تیمار ۱	تیمار۶	تیمار ۱۱
۱ مولار	تیمار ۲	تیمار ۷	تیمار ۱۲
۲ مولار	تیمار ۳	تیمار ۸	تیمار ۱۳
۳ مولار	تیمار ۴	تیمار ۹	تیمار ۱۴
۴ مولار	تیمار ۵	تیمار ۱۰	تیمار ۱۵

استخراج پروتئین‌ها و الکتروفورز به روش SDS-PAGE: بدین منظور ۵۰ میلی‌گرم از مخمر هر تیمار برداشت و پروتئین‌های محلول آن توسط بافر K حاوی مواد لیزکننده سلول و آنتی‌پروتئاز طبق پروتکل استاندارد استخراج شدند (Clegg و همکاران، ۱۹۹۴). سنجش پروتئین هر نمونه توسط دستگاه بیوفتومتر صورت گرفت. بدین صورت که ابتدا استاندارد BSA (Bovin Serum Albomin) برای دستگاه در نظر گرفته شد و از طریق میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر غلظت هر نمونه با رقّت (۱۹۰+۱۰ میکرولیتر) بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر (با سه تکرار) تعیین شد. بررسی فوق جهت بررسی افزایش احتمالی برخی پروتئین‌های محلول در مقایسه با نمونه‌های شاهد انجام شد. در ادامه به منظور پیدا نمودن بهترین استرس ترکیبی، بهترین استرس شوری و دمایی به‌صورت ترکیبی بر روی مخمرهای کشت داده شده اعمال شدند. اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های محلول و باندهای الکتروفورزی به‌همان صورت قبلی انجام شد.

بخش دوم: پرورش آرتمیا با استفاده از مخمرهای تحریک شده HSP: پس از مشخص شدن بهترین دما و

شوری تحریک‌کننده بیان پروتیئن‌های شوک حرارتی، سیست‌های دو گونه آرتمیا *A. urmiana* و *A. franciscana* از سیست بانک پژوهشکده آرتمیا تهیه شد. سیست‌های فوق پس از شستشو و خالص‌سازی در شرایط استاندارد آزمایشگاهی که شامل آب دریاچه ارومیه رقیق شده با شوری ۳۵ گرم در لیتر، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۸ مجهز به سیستم هوادهی و نور کافی تفریخ یافتند (Lavens و Sorgeloos، ۱۹۹۶). لاروهای اینستار ۱ پس از شمارش به تعداد ۵۰۰ ناپلیوس به درون بطری‌های یک لیتری واجد آب شور ۸۰ گرم در لیتر در ۴ تکرار منتقل شده و به‌مدت ۲۰ روز با ترکیبی از مخمر و جلبک تک‌سلولی *Dunaliella tertiolecta* پرورش یافتند (Coutteau و همکاران، ۱۹۹۲). آزمایش در ۴ تیمار مختلف شامل تیمار شاهد *A. franciscana* (تغذیه با مخمر معمولی و جلبک تک‌سلولی)، *A. franciscana* (تغذیه با مخمر HSP و جلبک تک‌سلولی)، تیمار شاهد *A. urmiana* (تغذیه با مخمر معمولی و جلبک تک‌سلولی) و *A. urmiana* (تغذیه با مخمر HSP و جلبک تک‌سلولی) انجام شد.

ظروف پرورشی در درون آکواریوم تحت شرایط استاندارد: دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بخاری برقی ۱۵۰وات، ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی با استفاده از لامپ‌های فلورسنس با شدت نور ۱۶۰۰ لوکس، هوادهی مداوم با پیپت پاستور قرار گرفتند. میزان رشد و بقاء طی روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ و۲۰ با تعویض هم زمان آب محیط پرورش انجام شد. برای تعیین درصد بازماندگی، تعداد آرتمیاها در هر یک از تکرارها در روزهای تعیین شده فوق شمارش شدند هم‌چنین به‌منظور تعیین میزان رشد، تعداد ۴ عدد آرتمیا از هر تکرار به‌طور تصادفی جدا شده و به درون محلول لوگول ۱ درصد منتقل گردید سپس طول کل آرتمیا از ابتدای ناحیه سر تا تلسون توسط استریو میکروسکوپ مجهز به لوله ترسیم رسم شده و سپس با استفاده از دستگاه دیجیتایزر بر حسب میلی‌متر بیان شد. در پایان روز بیستم آرتمیا هر تیمار به-طورجداگانه توسط فیلتر۴۰۰ میکرون فیلتر شده و جهت انجام تست استرس به‌صورت جفت (یک نر و یک ماده) در درون فالکون تیوب ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شدند.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری پس از بررسی نرمال بودن‌داده‌ها از طریق آزمون OnewayANOVA و آزمون Tukey از بسته نرم‌افزار SPSS-Ver.16 استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها p≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

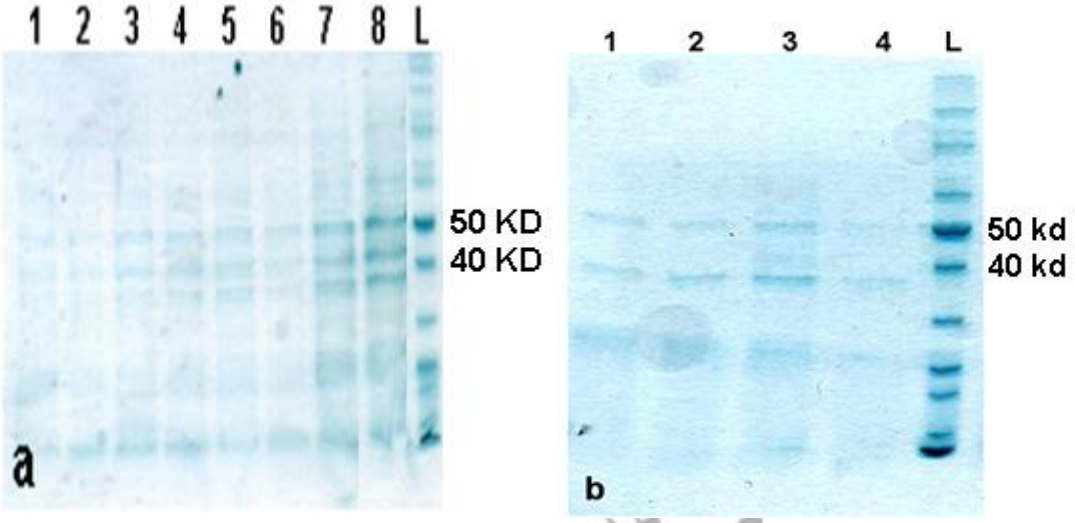
میزان پروتئین‌های محلول در نمونه‌های مختلف مخمر به همراه پروفایل الکتروفورزی پروتئین‌های محلول در جدول ۲ و شکل ۱ به‌ترتیب ارائه شده است.

جدول ۲: میزان پروتئین محلول استخراج شده از هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر

نوع استرس	درجه استرس	پروتئین‌های محلول
شوری	مولار ۱	۳۰/۴۰±۰/۴۰a
	مولار ۲	۱۱/۶۲±۰/۱۱b
	مولار ۳	۱۴/۸۲±۰/۱۳c
	مولار ۴	۴/۶۰±۰/۳۱d
دما	۳۰C	۱۶/۳۳±۰/۲۲e
	۳۵ C	۴/۵۹±۰/۰۵c
	۴۰C	۳/۳۴±۰/۲۰f
شاهد	۲۶ C و ۰/۹ مولار	۲۳/۲۳±۰/۳۶g

اعداد با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵).

نتایج میزان پروتئین‌های محلول تیمارهای ترکیب در جدول ۳ ارائه شده است. این بررسی نشان داد تمامی نمونه‌ها حاوی مقادیر مختلفی از پروتیئن‌های محلول با آنالیز آماری معنی‌دار مختلف هستند.



شکل ۱: الگوی پروتئین‌های محلول تهیه شده توسط الکتروفورز SDS-Page

a): الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول مربوط به استرس‌های شوری (به‌ترتیب ۱و۲ شوری ۱ مول، ۳ و ۴ شوری ۲ مول، ۵ و ۶ شوری ۳ مول، ۷ و ۸ شوری ۴ مول)؛ b): الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول مربوط به استرس‌های دما (به‌ترتیب ۱ دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۲ دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ، ۳ دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۴ دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد-شاهد). در هر دو ژل L معرف مارکر ۲۰۰ کیلو دالتون می‌باشد.

جدول ۳: میزان پروتئین محلول استخراج شده از هر نمونه بر حسب میلی‌لیتر

استرس	میزان پروتئین‌های محلول
۳ مولار و ۳۵درجه سانتی‌گراد	۱۱/۹۸±۰/۱۲a
۳ مولار و ۳۷ درجه سانتی‌گراد	۴/۵۵±۰/۵۵b
۳ مولار و ۴۰ درجه سانتی‌گراد	۱۷/۴۶±۰/۴۶c
۴ مولار و ۳۵ درجه سانتی‌گراد	۳/۳۳±۰/۳۴d
۴ مولار و ۳۷ درجه سانتی‌گراد	۲/۹۵±۰/۹۵e
۴ مولار و ۴۰ درجه سانتی‌گراد	۸/۰۵±۰/۰۵f
شاهد (۰/۹ مولار و۲۶ درجه سانتی‌گراد)	۲۰/۳۰±۰/۳۰g

اعداد با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵).

بررسی فوق در نهایت موجب شده تیمار هم‌زمان شوری ۴ مول بر لیتر و دمای ۴۰ درجه به‌عنوان بهترین استرس‌ها درنظر گرفته شود. این بررسی نشان داد که در هر دو استرس بیان پروتئین‌های ۷۵و پروتئینی با اندازه حدود ۶۰کیلودالتون افزایش داشته باشد. لیکن در تاثیر هم‌زمان شوری و دمای بهترین شوری ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳/۵ مولار استرس به‌عنوان بهترین تیمارها برای افزایش و تحریک پروتئین‌های شوک‌حرارتی انتخاب شدند. نتایج میزان رشد و بقاء *A. franciscana* و *A. urmian* در تیمارهای مختلف پرورشی (مخمر تحریک و مخمر معمولی) در جداول ۴ و ۵ خلاصه شده هست.

جدول ۴: میانگین ± انحراف معیار میزان رشد آرتمیا در تیمارهای مختلف پرورشی(برحسب میلی‌متر)

تیمار	روز سوم	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز بیستم
A. urmiana	۱/۳۲±۰/۱۲	۲/۵۴±۰/۳۴	۷/۱۰±۰/۵۰	۷/۲۱±۰/۴۵	۸/۶۳±۰/۸۹a
A. urmiana/HSP	۱/۳۵±۰/۲۰	۳/۴۰±۰/۵۵	۷/۰۱±۰/۶۶	۷/۰۱±۰/۸۸	۱۰/۵۲±۰/۷۶b
A. franciscana	۱/۳۴±۰/۱۱	۳/۵۹±۰/۶۸	۶/۳۳±۰/۷۳	۶/۷۰±۰/۶۷	۷/۶۷±۰/۹۸c
A. franciscana/ HSP	۱/۵۰±۰/۱۵	۳/۸۴±۰/۳۷	۷/۳۹±۰/۶۲	۷/۸۷±۱/۰۳	۹/۵۰±۰/۸۷d

اعداد هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵). آنالیز آماری تنها در انتهای دوره آزمایش انجام شده است.

بررسی‌های انجام شده نشان دهنده اختلاف آماری ما بین تیمارهای مختلف تغذیه شده با پروتئین‌های شوک حرارتی نسبت به دیگر تیمارها در انتهای دوره پرورش می‌باشد (p>۰/۰۵). در هر دو تیمار میزان رشد آرتمیا در انتهای دوره پرورش زمانی‌که از پروتئین‌های شوک حرارتی تغذیه شده‌اند بالاتر می‌باشد.

جدول ۵: میانگین ± انحراف معیار درصد بقاء آرتمیا در تیمارهای مختلف پرورشی (برحسب درصد)

تیمار	روز سوم	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز بیستم
A. urmiana	۸۸/۱۸±۸/۳۸	۶۳±۶/۷۸	۵۳/۹±۵/۲۷	۴۹/۸±۳/۲۸	۴۳/۴۳±۶/۱۸a
A. urmiana/HSP	۷۷/۱۸±۷/۲۸	۵۹/۷±۵/۴۷	۵۸/۹±۶/۶۳	۳۷/۱±۴/۶۵	۴۰/۸۵±۵/۰۹a
A. franciscana	۵۷/۴۴±۵/۶۸	۵۵/۹±۴/۳۷	۵۱/۳۵±۵/۳۴	۴۷/۵±۵/۳۴	۴۰/۲۵±۳/۱۱a
A. franciscana/HSP	۵۴/۴±۵/۳۴	۵۰/۳±۶/۴۵	۴۲/۲±۶/۰۹	۳۹/۲±۴/۸۸	۳۸/۲۵±۴/۴۵a

اعداد هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵). آنالیز آماری تنها در انتهای دوره آزمایش انجام شده است.

این تحقیق نشان داد هیچ اختلاف معنی‌داری در درصد بقاء مابین تمیارهای مختلف آزمایشی در تغذیه با پروتئین‌های شوک حرارتی در انتهای دوره پرورش ۲۰ روزه وجود ندارد (p>۰/۰۵). به‌منظور بررسی میزان مقاومت آرتمیای تغذیه شده نسبت به شرایط زیستی سخت (شوری ۲۵۰ گرم در لیتر و دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد)، آرتمیاهای تغذیه در تیمارهای مختلف شامل دو گونه آرتمیا با مخمرهای تحریک شده شوک حرارتی و مخمر معمولی در مقابل شرایط زیستی استرس‌زای فوق قرار گرفتند. نتایج این تحقیق در جداول ۶ و ۷ خلاصه شده هست.

جدول ۶: درصد بقاء آرتمیا در تیمارهای مختلف تحت استرس شوری بالا (۲۵۰ گرم در لیتر در مدت ۱۳ ساعت)

	A. urmiana	*A. urmiana*/HSP	*A. franciscana*	*A. franciscana*/HSP
ساعت صفر	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ساعت ۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ساعت ۲	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۸
ساعت ۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۷
ساعت ۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۷
ساعت ۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۷
ساعت ۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۶
ساعت ۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۶
ساعت ۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۴/۳
ساعت ۹	۹۶/۸۵	۹۶/۸	۱۰۰	۸۴/۳
ساعت ۱۰	۷۰/۳	۷۰/۳	۷۸/۱	۴۹/۸
ساعت ۱۱	۵۰	۶۲/۵	۲۹/۶	۱۵/۶
ساعت ۱۲	۴۵/۳	۵۳/۱	۱۷/۱	۱۲/۵
ساعت ۱۳	۳۲/۱±۱/۸a	۳۷/۵±۲/۱b	۱۲/۵±۱/۱c	۶/۹±۱/۱d

آنالیز آماری فقط برای انتهای دوره آزمایش انجام شده است. اعداد در ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵).

جدول ۷: درصد بقاء آرتمیا در تیمارهای مختلف تحت استرس دمای بالا (۳۴ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۳ساعت)

	A. urmiana	*A. urmiana*/HSP	*A. franciscana*	*A. franciscana*/HSP
ساعت صفر	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ساعت ۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ساعت ۲	۹۸/۴	۹۸/۴	۱۰۰	۱۰۰
ساعت ۳	۹۸/۴	۹۸/۴	۹۸/۴	۱۰۰
ساعت ۴	۹۶/۸	۹۶/۸	۹۶/۸	۱۰۰
ساعت ۵	۹۳/۷	۹۵/۳	۹۵/۳	۹۶/۸
ساعت ۶	۹۰/۶	۹۵/۳	۹۵/۳	۹۶/۸
ساعت ۷	۹۰/۶	۹۵/۳	۹۵/۳	۹۶/۸
ساعت ۸	۹۰/۶	۹۵/۳	۹۵/۳	۹۳/۷
ساعت ۹	۸۷/۵	۹۲/۱	۹۳/۷	۹۰/۶
ساعت ۱۰	۵۹/۳	۸۷/۵	۷۱/۸	۸۴/۳
ساعت ۱۱	۴۲/۱	۶۷/۱	۶۵/۶	۷۱/۸
ساعت ۱۲	۴۰/۶	۶۵/۶	۶۵/۶	۷۱/۸
ساعت ۱۳	۳۵/۹±۲/۱a	۶۰/۹±۲/۵b	۵۳/۱±۳/۸c	۶۸/۷±۴/۳d

آنالیز آماری فقط برای انتهای دوره آزمایش انجام شده است. اعداد در ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری هستند (p>۰/۰۵).

در هر دو آنالیز استرس شوری و دمای بالا اختلاف آماری در بین تمامی تیمارها در انتهای دوره پرورش مشاهده شده و تغذیه با پروتئین‌های شوک حرارتی نتایج بهتر در هر دو گروه نشان داد($p<۰/۰۵$).این تحقیق نشان داد که تحت تاثیر استرس شوری بالا (۲۵۰ گرم در لیتر در زمان ۱۳ساعت) میزان مقاومت *A. urmiana*/HSP بیش‌تر از *A. urmiana* است. در خصوص *A. franciscana* مشاهده شد که تغذیه با پروتئین‌های شوک حرارتی درنهایت موجب شده است میزان‌بقاء *A. franciscana* نسبت به نمونه شاهد (تغذیه با مخمر معمولی) کاهش داشته باشد. این بررسی هم‌چنین نشان داد که تحت تاثیر استرس دمای بالا (۳۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳ساعت) در کل میزان مقاومت *A. franciscana* بیش‌تر از *A. urmiana* و میزان مقاومت آرتمیای تغذیه شده با مخمر تحریک شده بیش از آرتمیای شاهد می‌باشد.

بحث

تحقیقات نشان داده که پتانسیل آبی *Saccharomyces cerevisiae* که تامین‌کننده اپتیمم‌شرایط برای رشدآن‌می‌باشد محدوده‌ای به اندازه ۰/۹ مولار و تقریباً معادل با غلظت سرم فیزیولوژی می‌باشد. هنگامی‌که مخمر تحت استرس یک عامل خارجی همانند شوری قرار می‌گیرد سلول مجبور به مقابله با شرایط وخیم خارجی شده و احتمالاً به‌عنوان یک چاره پروتئین‌های شوک حرارتی آن تحریک می‌شوند. مهم‌ترین پروتئین‌های شوک حرارتی که در مخمر شناسایی شده است عبارتند از ۱۲-۲۶-۳۰-۶۰-۷۰-۸۴-۱۰۴ کیلودالتون. یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های‌شوک‌حرارتی که درمخمر وظایف چاپرونی یا مولکول‌های حمایت‌کننده پروتئینی را دارد HSP60 می‌باشد که باعث جلوگیری از تجمع پروتئین و انباشته‌شدن پروتئین‌های غیرعادی می‌شود(Walker، ۱۹۹۸).بررسی بیان ژن و هم‌چنین پروفایل مخمرهای تحت استرس در این تحقیق نشان داد که مخمر تک‌سلولی *S. cerevisiae* تحت استرس شوری با افزایش بیان تعدادی ازپروتئین‌های شوک‌حرارتی اقدام به‌مقابله می‌کند. این بررسی‌ها نشان داده که از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی موثر در رشد و بقاء جانداران آبزی دما و شوری می‌باشد که تغییرات هر کدام از آن‌ها یا ترکیبی از هر دو آن‌ها در یک محدوده معین می‌تواند باعث ایجاد استرس قابل تحملی در جانداران آبزی شود (Williams و Geddes، ۱۹۹۱؛ Kinne، ۱۹۳۶).

با توجه به نقش پروتئین‌های شوک‌حرارتی در افزایش مقاومت جاندار نسبت به استرس‌های محیطی و با توجه به این‌که افزایش سطح این پروتئین‌ها در بدن اغلب نیازمند ایجاد استرس و شوک خارجی بوده و اغلب مواقع نمی‌تواند به‌موقع موجب بروز مقاومت داخلی شود. لذا در تعدادی از بررسی‌های مقدماتی انجام شده بر روی موجودات مختلف نشان داده شده که تغذیه با این دسته از پروتئین‌ها نیز می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی موجود زنده شود. در این تحقیقات مشخص شده است که این دسته از پروتئین‌ها دارای ساختمان تقریباً یکسانی در اغلب‌موجودات‌می‌باشندودرصورت ورود این پروتئین‌ها به‌هرنحو ممکن که شده باعث تقویت رشد و بقا در شرایط استرس‌زای محیطی‌خواهندشد(Soundarapandian و Saravanakumar، ۲۰۰۹). در این خصوص به اثبات رسیده هست که حتی اگر باکتری *Escherichia coli* که در آن HSP فعال است مورد تغذیه لارو آرتمیا قرار گیرد باعث افزایش مقاومت آن در برابر استرس می‌شود (Baruah و همکاران، ۲۰۱۰).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر در دوره پرورش ۲۰ روزه دو گونه آرتمیا در تغذیه با مخمر معمولی و مخمر تحریک شده میزان تلفات *A. franciscana* درمقایسه با *A. urmiana* بالا بیش‌تر می‌باشد. دلیل این اختلاف احتمالاً به‌خاطر استفاده از آب دریاچه ارومیه جهت این تحقیق بود که میزان سازش‌پذیری *A. urmiana* با این آب بیش از *A. franciscana* می‌باشد (Manaffar، ۲۰۱۲).باتوجه‌به داده‌های مربوط به زیست‌سنجی در *A. Urmiana* و *A. franciscana* تاثیر تغذیه با مخمرهای تحریک شده در انتهای دوره ۲۰ روزه کاملاً قابل مشاهده بود ($p<۰/۰۵$). این تحقیق در ادامه نشان داد که تحت تاثیر استرس شوری بالا (۲۵۰ گرم در لیتر در زمان ۱۳ ساعت) میزان مقاومت *A. urmiana*/HSP بیش‌تر از *A. urmiana* است که می‌تواند تحت تاثیر تاثیر مثبت مخمری تحریک شده باشد. در این تحقیق هم‌چنین میزان مقاومت *A. urmiana* بیش‌تر از *A. franciscana* نسبت به عوامل استرس‌زا حاصل شد. با توجه به این‌که *A. franciscana* به‌صورت ژنتیکی نسبت به دمای بالاتر مقاوم‌تر هست (حسینی و زارع، ۱۳۹۱) لذا در هر دو نوع تغذیه توانست بقاء بهتری را نسبت به *A. urmiana* در دماهای بالاتر از خود نشان دهد. اما در بررسی تاثیر استرس شوری آن‌چه مشهود بود نتایج بقاء بهتر *A. urmiana* نسبت به *A.franciscana* بود. بالا رفتن شوری دریاچه ارومیه در سال‌های اخیر و نوعی آدایتاسیون ایجاد شده در *A. urmiana* می‌تواند دلیل اصلی این مقاومت بالاتر به

استرس شوری در آرتمیای بومی باشد (Manaffar، ۲۰۱۲). به هرحال در تحقیق حاضر تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در مقابل استرس‌های محیط در هر دو آرتمیا (در هر دو استرس) نسبت به نمونه‌های تغذیه شده با مخمر معمولی به اثبات رسید. نتایج این تحقیق با تائید یافته‌های Baruah و همکارانش (۲۰۱۰) در خصوص تاثیر مثبت پروتئینه‌ای شوک حرارتی، در کل توانست این نکته را به اثبات رساند که پروتئین‌های شوک حرارتی در موجودات مختلف با وجود سایز و اندازه متفاوت تقریباً تاثیر یکسانی داشته در صورت تغذیه می‌توانند در تامین و تقویت سیستم ایمنی موجود که باعث افزایش مقاومت می‌شوند تاثیر مثبتی داشته باشند.

با توجه به این‌که استفاده از HSPs مخمر برای گونه‌های آرتمیا تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بود لذا مقایسه نتایج حاضر با یافته‌های قبلی میسر نشد لیکن نتایج تحقیق حاضر در توافق با یافته‌های پیشین Baruah و همکارانش (۲۰۱۰) و هم‌چنین Soundarapandian و Saravanakumar (۲۰۰۹) بر این نکته تاکید شد که ورود HSP به بدن آرتمیا موجب افزایش مقاومت جاندار نسبت به استرس‌های محیطی می‌شود (Sung و همکاران، ۲۰۰۹). یافته‌های قبلی نشان دادند که بدون توجه به نوع و منشاء پروتئین‌های HSP این پروتئین‌ها می‌توانند موجب تقویت موجود شوند (Skoultchi و Norowits، ۱۹۶۴). در این خصوص مشخص شده بود که حتی تغذیه با باکتری *Escherichia coli* که در آنHSP فعال شده می‌تواند موجب افزایش مقاومت آرتمیا در برابر استرس های محیط شود (Baruah و همکاران، ۲۰۱۰). آن‌چنان‌که از یافته تحقیق حاضر نیز مشخص شد شواهد و مدارک مستدلی درخصوص نقش پروتئین‌های شوک حرارتی خصوصاً HSP70 به‌عنوان یک عامل قوی که موجب تقویت پاسخ های ایمنی ذاتی و در برابر بسیاری از بیماری‌هاوجود دارد (Robert، ۲۰۰۳؛ Srivastava، ۲۰۰۲). براین اساس و به‌عنوان یک استراتژی قوی برای مبارزه با عفونت، به تازگی مشخص شده که HSPs می‌تواند در کنترل بیماری‌در آبزی‌پروری و القای HSP در آرتمیا به‌عنوان راه مقابله با عوامل بیماری‌زا مانند Vibrios اهمیت داشته باشد (Sung و همکاران، ۲۰۰۷).

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر و امکان تغذیه آرتمیا با پروتئین‌های شوک‌حرارتی مخمرهای تک‌سولی‌وامکان استفاده راحت از این دسته از تک‌سلولی‌ها در آبزی‌پروری به‌نظر می‌رسد بتوان راه حل ساده و بیوتکنولوژیکی برای افزایش مقاومت لارو آبزیان نسبت به عوامل کشنده پیدا نمود. خصوصاً این‌که مخمرهای تولیدشده پس ازاسترس‌های شوک‌حرارتی را می‌توان به‌راحتی خشک ونگهداری نمود لذا استفاده از چنین مخمرهای دستکاری شده می‌تواند به‌عنوان مکمل غذایی در غذای انواع آبزیان تاثیرات مثبت داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این‌تحقیق باحمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran Nationla Science Foundation: INSF) و مساعدت پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه انجام شد.بدین‌وسیله‌از کلیه کارشناسان و همکاران تحقیقاتی پژوهکشده آرتمیا و آبزیان کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **حسینی، ل. و زارع، ص.، ۱۳۹۱.** سازگاری مولکولی در *Artemia franciscana*, Kellog 1906 پس از ۱۰ سال حضور در زیستگاه جدید (دریاچه مهارلو، استان فارس). دوره ۳، شماره ۱، صفحات ۲۳ تا ۳۵.

۲. **کریم‌زاده، ص.؛ یانسری، ا.؛ کریم‌زاده، ق.؛ منیعی، م. و حمیدی، م.، ۱۳۸۸.** فواید و کاربرد پروبیوتیک‌ها در تغذیه دام، طیور و آبزیان. انتشارات آوای مسیح. ۱۷۴ صفحه.

۳. **واکر، گ.، ۱۳۹۱.** مخمر فیزیولوژی و بیوتکنولوژی. ترجمه پورنیا، پ. و کچوئی، ر. انتشارات جعفری. ۴۸۶ صفحه.

4. **Aoki, H.; Miyamoto, N.; Furuya, Y.; Mankura, M.; Endo, Y. and Fujimoto, K., 2002.** Incorporation and Accumulation of Docosahexaenoic Acid from the Medium by Pichiamethanolica HA-32. Biosci Biotechnol Biochem. Vol. 66, pp: 2632-2638.
5. **Baruah, K.; Ranjan, J.; Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2010.** Efficacy of heterologous and homologous heat shock protein 70s as protective agents to *Artemia franciscana* challenged with Vibrio campbellii. Fish & Shell fish Immunology. pp: 733-739.
6. **Baruah, K.; Norouzitallab, P.; Shihao, Li.; Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2012.** Feeding truncated heat shock protein 70s protect *Artemia franciscana* against virulent Vibrio campbellii challenge Fish and Shellfish Immunology.pp: 1-9.
7. **Balcazar, J.L., 2003.** Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeu svannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.

8. **Browne, R.A. and Wanigasekera, G., 2000.** Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of Artemia. pp: 29-42.
9. **Cara, J.B.; Aluru, N.; Moyano, F.J. and Vijayan, M.M., 2005.** Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression inlarval gilthead sea bream and rainbow trout Comparative Biochemistry and Physiology. 142 p.
10. **Clegg, J.S.; Jackson, S.A. and Popov, V.I., 2003.** Long-term anoxia in encysted embryos of the crustacean, Artemia franciscana: viability, ultrastructure, and stress proteins, Cell Tissue Res. Vol. 301, pp: 433-446.
11. **Coutteau, P.; Brendonck, L.; Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992.** The use of manipulated baker'syeast as an algal substitute for laboratory culture of Anostraca, Hydrobiologia. Vol. 234, pp: 25-32.
12. **Feder, M.E. and Hofmann, G.E., 1999.** Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology. Vol. 61, pp: 243-282.
13. **Iwama, G.K.; Thomas, P.T.; Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M. 1998.** Heat shock protein expression in fish. Rev. Fish Biol. Fish. Vol. 8, pp: 35-56.
14. **Kinne, O., 1963.** The effect of temperature and salinity on marine and brackish water animals. 1. Temperature. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. Vol. 1, pp: 301–340.
15. **Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for Aquaculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center, University of Gent, Belgium. Published by: Food and Agriculture Organization of the unitednations (FAO Fisheries Technical paper). 295 P.
16. **Lindquist, S. and Craig, E.A., 1988.** The heat-shock proteins. A. Rev. Genet. Vol. 22, pp: 631-677.
17. **Lindquist, S., 1993.** Auto regulation of the heat-shock response. In Translational Regulation of Gene Expression 2 (ed. J. Ilan), pp: 279-320. New York: Plenum Press.
18. **Manaffar, R., 2012.** Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 160 P.
19. **Prohaszka, Z. and Fust, G., 2004.** Immunological aspects of heat-shock proteins the optimum stress of life. Mol Immunol. Vol. 41, pp: 29-44.
20. **Robert, J., 2003.** Evolution of heat shock protein and immunity. Dev Comp Immunol. Vol. 27, pp: 449-64.
21. **Sanders, B.M.; Nguyen, J.; Martin, L.S.; Howe, S.R. and Coventry, S., 1995.** Induction and subcellular localization of two major stress proteins in response to copper in the fathead minnow Pimephales promelas. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 112, pp: 335-343.
22. **Sankiyan, Z.; Heydari, R. and Manaffar, R., 2011.** Expression of 90 KDa heat shock proteins in the brine shrimp *Artemia (Crustacean:* Anostraca) in response to high salinity stress. International Journal of *Artemia* Biology. Vol. 1, No. 1, pp: 3-12.
23. **Skoultchi, A.I. and Morowitz, H.J., 1964.** Information age and survival of biological systems at temperatures near absolute zero. Yale J. Biol. Made. Vol. 37, pp: 158-163.
24. **Srivastava, P., 2002.** Roles of heat heat shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. Vol. 2, pp: 185-194.
25. **Somero, G.N., 1995.** Proteins and temperature. Annual Review of Physiology. Vol. 57, pp: 43-68.
26. **Soundarapandian, P. and Saravanakumar, G., 2009.** Effect of Different Salinities on the Survival and Growth of *Artemia* Spp Current Research Journal of Biological Sciences. Vol. 1, No. 2, pp: 20-22.
27. **Sung, Y.Y.; Ashame, M.F.; Chen, S.H.; MacRae, T.H.; Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2009.** Feeding Artemia franciscana (Kellogg) larvae with bacterial heat shock protein protects from Vibrio campbellii Infection Journal of Fish Diseases. Vol. 32, pp: 675–685.
28. **Sung, Y.Y.; Van Damme, E.J.M.; Sorgeloos, P. and Bossier, P. 2007.** Non-lethal heat shock protects gnotobiotic Artemia franciscana larvae against virulent Vibrios. Fish Shell fish Immunol. Vol. 22, pp: 318-26.
29. **Walker, G.M., 1998.** Yeast Physiology and Biotechnology. Chichester, UK: J.Wiley & Sons. 162 p.
30. **Williams, W.D. and Geddes, M.C., 1991**. Anostracans of Australians salt lakes, with particular references to a comparison of Par*Artemia* and *Artemia*. In: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N.A. (Eds.), *Artemia* Biology, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp: 351-368.