اثرات سطوح مختلف لایزوزیم جیره غذایی بر فاکتورهای رشد، شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرمی در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

- **شراره بخت‌آزاد***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **حامد پاک‌نژاد**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **سیدحسین حسینی‌فر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **عبدالمجید حاجی‌مرادلو**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر لایزوزیم در مقیاس‌های اضافه شده به جیره در برخی فاکتورهای رشد، شاخص‌های ایمنی خون شناسی، بیوشیمیایی سرم در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) می‌باشد. به این منظور ۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۱/۰±۲۵/۹٤ گرم در ۱۲ عدد تانک و ٤ تیمار با ۳ تکرار قرار داده شدند. پس از دوره سازگاری، ماهی‌ها با جیره‌های حاوی ۰ ، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم لایزوزیم به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در انتهای دوره ماهیان زیست‌سنجی شدند و خونگیری به‌عمل آمد و شاخص‌های خونی بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد این محرک ایمنی در میزان رشد به‌میزان حدوداً ۲٦/۳۷ گرم تاثیر مثبت داشته و بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (p<۰/۰۵). لایزوزیم جیره بر تعداد گلبول‌های سفید تیمارها با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. بین تیمارهای آزمایشی در تعداد هموگلوبین نیز روند افزایشی مشاهده شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید فقط در میزان لنفوسیت افزایش معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده شد، در بررسی میزان نوتروفیل بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری دیده شد. هم‌چنین در مطالعه شاخص‌های بیوشیمیایی خون، مشخص شد که در هر سه فاکتور اختلاف معنی‌داری وجود داشت و روند افزایشی داشتند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد استفاده از دوزهای۱ و۱/۵ گرم بر کیلوگرم لایزوزیم می‌تواند به بهبود فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم و رشد این‌گونه پرورشی تاثیر مطلوبی داشته باشد.

کلمات کلیدی: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، عملکرد رشد، خون‌شناسی، آنزیم لایزوزیم

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Sharare.bazaad@gmail.com

مقدمه

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌عنوان اولین گونه پرورشی در بین آبزیان شناخته می‌شود (Balon، ۲۰۰۴). کپور معمولی بومی قاره آسیا می‌باشد و به همه نقاط جهان به‌جز قطبین راه یافته است از مزایای پرورش کپورماهیان می‌توان به رشد مطلوب و مناسب، مقاومت در برابر بیماری‌ها و شرایط محیطی نامطلوب و دارا بودن نسبت مناسب حجم عضله یا گوشت به استخوان و احشاء اشاره کرد. درسال‌های اخیر آبزی‌پروری با نرخ رشد متوسط سالانه ۶ درصد در مقایسه با صید و تولید گوشت حیوانات خشکی، بیش‌ترین رشد را در بخش تولید غذا در جهان داشته و در حال حاضر حدود ۵۰ درصد ازگوشت آبزیان مصرفی دنیا را تامین می‌کند و برنامه‌ریزی شده‌که تا سال ۲۰۳۰ این مقدار به ۶۲ درصد برسد (FAO، ۲۰۱۴). در سطح جهانی آبزی پروری در حال گسترش است و این گسترش به‌دو صورت کلی افزایش تراکم و یا افزایش تنوع گونه‌های پرورشی می‌باشد. در این شرایط، بروز و شیوع بیماری، اصلی‌ترین عامل محدودکننده برای پرورش بسیاری از گونه‌های آبزی در بسیاری از کشورها می‌باشد (Bondad و همکاران، ۲۰۱۳). با افزایش روز افزون جمعیت جهان نقش آبزی‌پروری نسبت به صنایع‌دیگر در تولید غذا بیش‌تر شده است (FAO، ۲۰۰۹). آبزی‌پروری یکی از زیرشاخه‌های مهم تولیدات غذایی برای جمعیت بشر می‌باشد و امروزه نیازمند توسعه مناسب برای پاسخ‌گویی به نیازهای پرورش‌دهندگان و جمعیت مصرف‌کننده است که در حال حاضر با توجه به فوایند آبزیان تقاضا به سمت این منبع پروتئینی درحال افزایش است (عادلی، ۱۳۸۷). امروزه در مدیریت آبزی‌پروری با توجه به شرایط خاص از قبیل افزایش آلودگی‌های مختلف،عوامل استرس‌زا، ارتباط آب‌های آزادو مزارع‌پرورشی‌و پیچیده شدن اکوسیستم‌های آبزیان توجه به بهبود سیستم ایمنی درمقابل عوامل بیماری‌زارا ضروری می‌کند. در حال حاضر در این صنعت برای بهبود سلامت و افزایش مقاومت آبزیان در برابر این بیماری‌ها استفاده از مکمل‌های غذایی جهت ارتقای رشد و ایمنی متداول گردیده است (Gatlin و Li، ۲۰۰۴). آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله راه‌کارهای سنتی برای درمان بیماری‌ها و هم‌چنین جزو مواد محرک‌رشد در آبزی‌پروری می‌باشندکه می‌توانندرشدو کارایی تغذیه را در آبزیان بهبود ببخشند و سبب بالارفتن قابلیت هضم و جذب مواد غذایی گردند. استفاده از انتی‌بیوتیک‌ها در جهت درمان و کنترل بیماری‌های آبزیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است. با این وجود نگرانی‌ها در مورد اثرات منفی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بر محیط‌زیست و سلامت بشراز جمله ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تجمع بقایای آن‌در بافت‌های خوراکی‌و تضعیف سیستم ایمنی بنابراین اهمیت برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از کشورها را به‌دنبال داشت (Reverterو همکاران، ۲۰۱۴). بر این اساس ممنوعیت استفاده آنتی‌بیوتیک‌هابعدازسال۲۰۰۶دراروپااجباری‌شد(Castanon، ۲۰۰۷). این مقررات توانست بر صنعت آبزی‌پروری تأثیر گذاشته و توجه به ایجاد روش‌های جدید برای کنترل بیماری‌ها را بیش‌تر کند. در این راستا یکی از راه‌حل‌های موردتاییدبرای‌کنترل‌و پیشگیری از بیماری‌ها پروبیوتیک‌ها هستند اما با توجه به این موضوع که نحوه عملکرد باکتری‌های پروبیوتیک هنوز جای ابهام داشته و هم‌چنین به‌دلیل آن که سویه‌های پروبیوتیکی فقط در طی تیمارهای تغذیه‌ای در دستگاه گوارش غالب هستند و از طرفی قابلیت پایداری سویه‌های پروبیوتیکی درطی عمل‌آوری ساخت جیره‌های‌غذایی و ذخیره‌سازی آن‌ها نیز یک محدودیت عمده در استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری می‌باشد (Mahious و همکاران، ۲۰۰۷)، استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی به‌عنوان یک ابزاردرمانی‌منحصربه‌فردبا قابلیت دست‌یابی به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار امیدبخش بوده است. پپتیدهای ضدمیکروبی معمولاً به چند دلیل مورد استفاده قرار می‌گیرند: ۱) برای جلوگیری از بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری ها یا پروتوزوئیدها، ۲) کاهش میزان غذای مورد نیاز و ۳) افزایش وزن و بهبود شاخص‌های رشد (Herbert، ۱۹۸۷). نتایج موثر و کاربردی استفاده از این مولکول‌های با ارزش طی بررسی‌های مختلف در سالیان گذشته منتشر گردیده است. نتایج مؤثر و کاربردی استفاده از این مولکول‌های مذکور طی بررسی‌های مختلف در سالیان گذشته منتشر گردیده است. لایزوزیم به‌عنوان آنتی‌بیوتیکی در داخل بدن بی‌خطر بوده و بسیار مورد توجه است (Ramanauskien و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات متفاوتی درباره نحوه به‌کارگیری و مکانیسم‌های اثر لایزوزیم در پرورش دام و آبزیان انجام گرفته که عمده آن‌ها نشان‌دهنده بهبود شاخص‌های رشد در ماهیان (Chen و همکاران، ۲۰۱۴)، (Deng و همکاران، ۲۰۱۲) و جوجه‌های‌گوشتی (Zhang و همکاران، ۲۰۰۸)؛ (Cheng و همکاران، ۲۰۰۹)، (Ding و همکاران، ۲۰۱۰) بوده است. هم‌چنین پارامترهای ایمنی مورد مطالعه قرار گرفته (Morand و همکاران، ۱۹۹۹)، (Long و همکارن، ۲۰۱۶) بیانگر کارایی مثبت این آنزیم بر روی دام و آبزیان می‌باشد. لایزوزیم یک آنزیم تجزیه‌کننده قوی موجود در خون و بافت‌های‌لنفاوی ماهیان می‌باشد. این آنزیم نقش‌های زیادی در ایمنی ماهی دارد که یکی از مهم‌ترین فاکتورها در مقاومت ماهیان محسوب می‌شود(Magnadóttir، ۲۰۰۶).دراغلب‌جانوران،آنزیم‌لایزوزیم بخشی از سیستم دفاع غیراختصاصی را تشکیل می‌دهد. فعالیت ضدباکتریایی این آنزیم، مربوط به هیدرولیز پیوندهای –N استیل گلوکز آمین و N استیل مورامیک اسید است. این مولکول‌ها اجزای تشکیل‌دهنده لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشند. با توجه به

اثرات آن، استفاده از این آنزیم در غذاها و سیستم‌های تغذیه توصیه شده است (Ramanauskien و همکاران، ۲۰۰۹). تا به‌امروز مطالعات بسیاری درخصوص بررسی اثرات لایزوزیم جیره بر رشد و ایمنی حیوانات انجام شده است (Wang، ۲۰۰۹؛ Cheng، ۲۰۰۹؛ Lu و همکاران، ۲۰۰۹). اما در مورد آبزیان این مطالعات محدود می‌باشند. بنابراین در این تحقیق سعی شده اثر این آنزیم به‌عنوان یک محرک ایمنی روی فاکتورهای رشد، شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم یک گونه پرورشی مهم مورد بررسی قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در سالن آبزی‌پروری دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انجام گرفت. کپور ماهیان از یک مرکز خصوصی در شهرستان ساری تهیه گردید پس از انتقال به‌مدت دو هفته با شرایط محیط سازگاری پیدا کردند. در این مطالعه از ۱۲ تانک با حجم ۱۵۰ لیتر استفاده شد. برای این منظور ۱۵ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۲۵/۹۴±۰/۱ گرم به‌صورت کاملاً تصادفی در ۴ تیمار که هر تیمار ۳ تکرار بود توزیع گردید. در طول مدت زمان سازگاری ماهی‌ها با جیره شاهد (جیره غذایی تجاری+ژلاتین) و پس از آن با جیره آزمایشی تغذیه شدند. به‌منظور بررسی تاثیر این افزودنی بر عملکرد رشد، شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرمی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۴ تیمار غذایی تهیه شد. بچه‌ماهیان در تیمار ۱، ۲، ۳، ۴ به‌ترتیب (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵) گرم بر کیلوگرم به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. لایزوزیم خوراکی (Zhejiang Aegis Biotech Co.,Ltd) پس از تهیه کردن به جیره‌غذایی هر گروه آزمایشی اسپری شد و برای هر کدام از گروه‌های مورد بررسی، استفاده گردید. تغذیه بچه‌ماهیان در سه نوبت به‌میزان ۳ درصد وزن بدن صورت گرفت به‌منظور تعیین مقدار غذای بچه‌ماهیان در ابتدای دوره آزمایش، زیست‌سنجی هر تانک صورت گرفت. توزیع غذای بچه‌ماهیان روزانه انجام شد. در پایان دوره ۸ هفته پرورش، از ماهیان زیست‌سنجی صورت گرفت و میزان رشد و بقا در ابتدا و انتهای دوره به‌واسطه فرمول‌های فوق مورد سنجش قرار گرفت.

افزایش وزن بدن (Tacon، ۱۹۹۰):

وزن اولیه ماهی (میلی‌گرم) - وزن نهایی ماهی (میلی‌گرم)

درصد افزایش وزن بدن (Bekcan و همکاران، ۲۰۰۶):

۱۰۰×{وزن اولیه ماهی/(وزن اولیه ماهی (گرم) - وزن نهایی ماهی (گرم))}

نرخ رشد ویژه (Hevrøy و همکاران، ۲۰۰۵):

۱۰۰×{طول دوره پرورش به روز/(لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی - لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی)}

ضریب تبدیل غذایی بیش‌تر نشان‌دهنده مقدار غذای مورد استفاده در هر آکواریوم می‌باشد زیرا اطمینان از این‌که تمام غذای داده شده مورداستفاده ماهیان قرار گرفته است وجود ندارد (Hevrøy و همکاران، ۲۰۰۵):

افزایش وزن (میلی‌گرم)/مقدار غذای خورده شده (میلی‌گرم)

شاخص بازماندگی (درصد بقا) (Ai و همکاران، ۲۰۰۶):

۱۰۰×{تعداد ماهیان در ابتدای دوره /(تعداد ماهیان مرده در طول دوره- تعداد ماهیان در ابتدای دوره)}

سپس از هر تیمار تعداد ۶ عدد بچه‌ماهی به‌طور تصادفی جهت خونگیری و سنجش فاکتورهای خون‌شناسی انتخاب شدند. ابتدا ماهیان توسط پودر گل‌میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر) بی‌هوش شدند و خونگیری از قسمت انتهایی باله مخرجی ماهیان توسط سرنگ هپارینه صورت گرفت. پس از خونگیری نمونه‌های خون جمع‌آوری شدند و به ۲ قسمت تقسیم شدند.

بخش اول: خون در نمونه‌های حاوی ماده ضدانعقاد خون قرار گرفتند تا شمارش گلبول‌قرمز و گلبول‌سفید و میزان هماتوکریت صورت گیرد. شمارش گلبول‌سفید و قرمز توسط لام هماسیتومتر انجام شد. شمارش تعداد گلبول‌های‌سفید با استفاده از پیپت ملانژور سفید، لام نئوبار و محلول رقیق کننده تورک (Turk) شمارش شدند (Blaxhall و Daisley، ۱۹۷۳). برای شمارش تعداد گلبول‌های‌قرمز از رقیق کننده NaCl دو درصد و لام نئوبار استفاده شد. اندازه‌گیری میزان هماتوکریت توسط میکروهماتوکریت، نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در لوله‌های مویین به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوز شدند و هموگلوبین نیز توسط اسپکتروفتومتر با معرف درابکین (Drobkin) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک از منحنی استاندارد براساس روش sahli صورت گرفت. شمارش افتراقی انواع گلبول سفید (نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت و منوسیت) پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا صورت پذیرفت (عامری‌مهابادی، ۱۳۷۸).

بخش دوم: نمونه‌های خون در لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد خون (هپارین) قرار گرفت و پس از لخته تشکیل شدن، سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه و دور ۶۰۰۰ توسط سمپلر از لخته جداسازی شد و در اپندورف‌های جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های سرم جداسازی شده با استفاده از کیت‌های آزمایشی از شرکت پارس‌آزمون برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی سرم تا زمان انجام آزمایش در فریزرهای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. این آزمایش به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از ثبت داده‌ها همگنی آن‌ها با استفاده از kolomogornove-Smirnove بررسی شد. برای مقایسه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ($p<0/05$) از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون چند دامنه دانکن (Duncans)

(multiple-range test) استفاده گردید (Zar، ۱۹۹۴). کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج

در پایان دوره تحقیقاتی با انجام سری آزمایشاتی که بر روی ماهیان صورت گرفت اثر سطوح مختلف لایزوزیم خوراکی بر شاخص‌های رشد در جدول ۱ ارائه شد که در ابتدا اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر وزن و طول وجود نداشت (p>۰/۰۵). بررسی شاخص‌های رشد در پایان دوره نشان داد افزودن سطوح مختلف لایزوزیم خوراکی به جیره‌غذایی کپور ماهیان به‌طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص وزن شد (p>۰/۰۵). اما در مورد اندازه بدن، در پایان دوره با این‌که افزایش طول وجود داشت، در میان تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). به‌طوری‌که ماهیان تغذیه شده با دوزهای بیش‌تر لایزوزیم بیش‌ترین میزان رشد وزنی را داشتند. هم‌چنین در تمام دوره پرورشی تلفاتی در بین تیمارهای تحت بررسی مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در بررسی میزان نرخ رشد ویژه بالاترین میزان در تیمار ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین در گروه شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری بودند(p<۰/۰۵)و بین گروه ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج به‌دست آمده از محاسبه ضریب تبدیل غذایی نشان داد که به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین میزان به گروه ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و شاهد تعلق داشت و بین دو گروه ۰/۵ و ۱ گرم برگیلوگرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). هم‌چنین در بررسی کارایی پروتئین مشخص شد که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان به گروه‌های تیمار ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و شاهد مربوط بوده و اختلاف معنی‌داری باهم داشتند (p<۰/۰۵).

جدول۱: بررسی برخی فاکتورهای رشد در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با لایزوزیم خوراکی

عملکرد رشد	۰ گرم برکیلوگرم	۰/۵گرم برکیلوگرم	۱ گرم برکیلوگرم	۱/۵گرم برکیلوگرم
میانگین وزن اولیه (گرم)	۲۵/۷۱±۰/۱۵	۲۵/۸۶±۰/۱۱	۲۵/۹۳±۰/۲۲	۲۵/۹۹±۰/۱۱
میانگین وزن نهایی (گرم)	۴۷/۸۵±۱/۲^{b}	۵۳/۶۴±۵/۸^{ab}	۵۳/۳±۶/۰۹^{ab}	۵۵/۱۹±۲/۵۴^{a}
میانگین طول اولیه (سانتی متر)	۱۰/۴±۰/۲	۱۰/۵±۰/۳۷	۱۰/۳۴±۰/۳	۱۰/۶۷±۰/۲
میانگین طول ثانویه (سانتی متر)	۱۳/۴۴±۰/۷۹^{b}	۱۴/۰۴±۰،۸^{ab}	۱۴±۰/۹^{ab}	۱۴/۸۷±۰/۸۴^{a}
افزایش وزن (گرم)	۲۲/۱۴±۱/۲۶^{b}	۲۶/۷۷±۵/۷۴^{ab}	۲۷/۳۷±۵/۲۱^{ab}	۲۹/۲±۲/۵۵^{a}
نرخ رشد ویژه (درصد)	۰/۴۸±۰/۰۲^{b}	۰/۵۵±۰/۰۸^{ab}	۰/۵۵±۰/۰۸^{ab}	۰/۵۸±۰/۰۳^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۲±۱/۰۴^{a}	۱/۵۴±۰/۱۹^{ab}	۱/۴۷±۰/۲^{ab}	۱/۳۴±۰/۰۸^{b}
کارایی پروتئین	۰/۱۱±۰/۰۰۲	۰/۱۲±۰/۰۰۱	۰/۱۲±۰/۰۰۲^{a}	۰/۱۲±۰/۰۰۴^{a}
بقا (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشند(p<۰/۰۵)

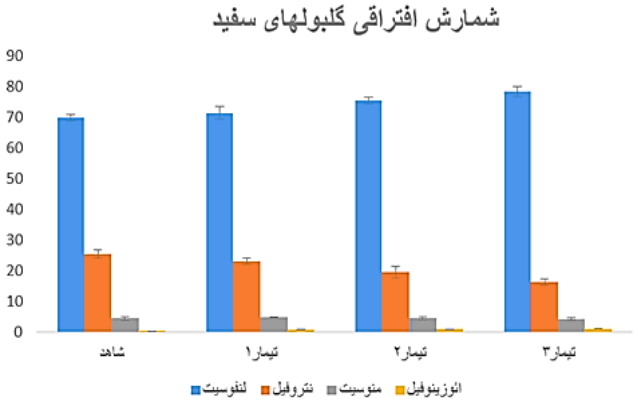
نتایج مربوط به آنالیز شاخص‌های خون شناسی در تیمارهای مختلف در جدول شماره ۲ آمده است. تعداد گلبول‌های‌قرمز در ماهیان پرورشی گروه شاهد با تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند(p>۰/۰۵) در مورد شاخص‌های هماتوکریت و هموگلوبین نیز در میزان هموگلوبین خون تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵)؛ اما در درصد هماتوکریت نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تغذیه شده با تیمار شاهد مشاهده گردید (p<۰/۰۵). شمارش تعداد گلبول‌های سفید نشان داد که بین گروه شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵). بیش‌ترین تعداد آن در تیمار ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین در گروه شاهد مشاهده شد.

جدول۲: بررسی شاخص‌های سرم خون در ماهی کپور معمولی پس از ۸ هفته تغذیه با جیره آزمایشی

فاکتورهای اندازه‌گیری	شاهد	۰/۵	۱	۱/۵
هماتوکریت (Hc)	۳۵±۱	۳۱±۲	۲۹/۵±۱	۳۴±۱/۱۲
هموگلوبین (Hg)	۵/۶۷±۱/۲۶^{b}	۷/۱۵±۱^{ab}	۷/۲۲±۱/۳^{ab}	۸/۱۵±۱^{a}
تعداد گلبول قرمز (RBC)	۱/۶۵±۰/۲^{b}	۱/۶۶±۰/۱^{b}	۱/۷۳±۰/۲۵^{a}	۱/۶۹±۰/۱^{a}
تعداد گلبول سفید (WBC)	۳۶/۳۳±۱/۵۱^{b}	۳۷/۱۲۲±۱/۰۶^{ab}	۴۲/۲۹۴±۱/۰۶^{a}	۴۳/۴۹۵±۱^{a}

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشند(p<۰/۰۵)

در نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های‌سفید، اختلاف معنی‌داری در بین گونه‌ها از نظر تعداد در بازوفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و منوسیت‌ها مشاهده نشد(p>۰/۰۵). اما با افزایش‌دوز لایزوزیم در جیره غذایی، شاهد بالا رفتن درصد لنفوسیت‌ها در خون ماهیان شد (p<۰/۰۵).کم‌ترین میزان لنفوسیت در گروه شاهد مشاهده شد. در بررسی درصد نوتروفیل، با افزایش دز لایزوزیم به جیره روند کاهشی در میزان آن دیده شد به‌نحوی‌که کم‌ترین درصد در گروه ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و بیش‌ترین در گروه شاهد مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد در بین تیمارهای ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم وجود نداشت (p>۰/۰۵).



شکل ۱: نمودار شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در پایان دوره آزمایشی

جدول۳: شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ماهیان در پایان دوره آزمایشی

شاخص‌های خونی	شاهد	۰/۵	۱	۱/۵
لنفوسیت (٪)	۶۹/۸۶	۷۱/۳۳	۷۵/۳۳	۷۸/۳۳
نتروفیل (٪)	۲۵/۴۸	۲۳	۱۹/۵۱	۱۶/۱۷
منوسیت (٪)	۴/۳۳	۴/۶۸	۴/۳۳	۴/۱۷
بازوفیل (٪)	۰	۰/۳۳	۰	۰/۳۳
ائوزینوفیل (٪)	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۸۳	۱

در نتایج به‌دست آمده از سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در دوره ۸ هفته، میزان گلوکز در تیمارهای تغذیه شده با جیره آزمایشی بیش‌تر از گروه شاهد بود و در تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده‌شد (p<۰/۰۵). در سنجش پروتئین کل بیش‌تری و کم‌ترین میزان آن به‌ترتیب در گروه ۱/۵ گرم بر گیلوگرم و شاهد دیده شد و بین‌شان اختلاف معنی‌دار وجودداشت (p<۰/۰۵). هم‌چنین در بررسی میزان ایمنوگلولین سرم نیز در تیمار ۱/۵٪ افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد مشاهده شد و با هم اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵).

جدول۴: بررسی برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم در ماهیان پس از ۸ هفته آزمایش

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم	شاهد	۰/۵گرم برکیلوگرم	۱ گرم برکیلوگرم	۱/۵ گرم برکیلوگرم
گلوکز (میلی‌مول بر لیتر)	۵۸/۱۶±۲^{b}	۶۰/۷±۱^{ab}	۶۵/۳۳±۱^{ab}	۷۶/۱۲±۱^{a}
پروتئین کل (گرم/دسی‌لیتر)	۴۸/۲±۱^{b}	۶۷±۱/۱۷^{ab}	۷۵±۲^{a}	۷۶/۲±۱,۵^{a}
ایمنوگلوبولین (گرم/دسی‌لیتر)	۱۳/۵۶±۱/۵۶^{b}	۱۵/۲۳±۱/۱۵^{ab}	۱۵/۹۳±۱^{ab}	۱۷/۲۷±۱^{a}

بحث

باادامه رشد صنعت آبزی‌پروری، درک نیازهای ضروری گونه‌های پرورشی با توجه به تاثیر مستقیم آن‌ها بر عوامل استرس‌زا، سلامتی و مقاومت در برابر بیماری‌ها توجه بیش‌تری را می‌طلبد (Ashley، ۲۰۰۷). براساس مطالعات انجام شده استفاده و تجویز برخی محرک‌های ایمنی خاص از جمله آنزیم لایزوزیم جهت جلوگیری از بیماری و تقویت سیستم ایمنی بدن جانور به‌عنوان رژیم کنترلی وجود دارد.

رژیم‌های غذایی، اثرات بسیار زیادی بر کنترل استرس و حفظ سلامتی دارند و بنابراین برای رشد مناسب، مقاومت در برابر استرس و جلوگیری از بیماری‌ها، ماهی باید مقادیر کافی از رژیم‌های غذایی که تمام نیازهای غذایی آن‌ها را تامین می‌کند، در دسترس داشته باشد (Trichet، ۲۰۱۰). لایزوزیم یک عامل ضدمیکروبی طبیعی است زیرا هیدرولیز اوربیتال‌های گلیکوزیدی و موکوپلی ساکاریدی در دیواره سلولی باکتریایی را کاتالیز می‌کند و به افزایش رشد کمک کند. Zhang و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم لایزوزیم خوراکی در جیره‌غذایی جوجه‌های گوشتی باعث بالا رفتن وزن و بهبود کارایی غذا می‌شود. در تحقیقات مشابه Cheng و همکاران (۲۰۰۹)، Lu و همکاران (۲۰۰۹) و Ding (۲۰۱۰) دریافتند به‌کارگیری ۱۰۰ تا ۳۰۰ گرم بر کیلوگرم لایزوزیم خوراکی در جیره‌غذایی جوجه‌های گوشتی موجب افزایش شاخص‌های رشد می‌شود. در همین راستا Gu و Zhang (۲۰۰۸) بیان داشتند افزودن ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم لایزوزیم خوراکی به رژیم‌غذایی خوک می‌تواند شاخص‌های رشد را به‌خوبی بهبود بخشد. به‌علاوه Chen و همکاران (۲۰۱۴) پس از ۷۵ روز تغذیه بچه‌ماهی کاراس سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم لایزوزیم خوراکی را برای افزایش رشد و بهبود

ضریب تبدیل غذایی پیشنهاد کردند. در مطالعه‌ای دیگر اثرات افزودن لایزوزیم خوراکی به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی ۷۰ روز بررسی شد که نتیجه آن افزایش رشد، بهبود وضعیت بدن، کاهش ضریب تبدیل غذایی و حفظ مواد مغذی هنگام استفاده از ۱۰۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بود (Deng و همکاران، ۲۰۱۲). به‌علاوه Chen و همکاران (۲۰۱۳) پس از ۷۵ روز تغذیه بچه ماهی کاراس سطح ۱۰۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم لیزوزیم خوراکی را برای افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی پیشنهاد کردند. این نتایج نشان می‌دهد که مکمل لایزوزیم در رژیم غذایی به‌عنوان یک محرک رشد به شمار می‌رود.

تغذیه نقش مهمی در حفظ شرایط بهداشتی آبزیان با تنظیم سیستم ایمنی غیرسلولی و هومورال دارد که در نتیجه موجب افزایش مقاومت در برابر انواع مختلف بیماری‌ها می‌شود (Komar، ۲۰۰۵). درک مکانیسم‌های تنظیم سیستم ایمنی دلیلی محکمی برای کشف عوامل موثر بر رژیم غذایی است که در نهایت منجر به بهبود اثرات ایمنی در ماهیان می‌شود (Trichet، ۲۰۱۰). از راه‌حل‌های کاهش خطر ابتلا ماهیان به بیماری‌های مختل‌کننده سیستم ایمنی و افزایش کارایی آن،افزودن آنزیم‌های ضدمیکروبی در رژیم غذایی است (Yeman و Yount، ۲۰۰۳). لایزوزیم در بافت‌های ماهی مانند سرم، آبشش، دستگاه گوارش و بافت غنی از لکوسیت‌ها مانند کلیه و طحال یافت می‌شود. در ماهی‌ها به‌دلیل محدودیت‌های ایمنی اکتسابی، ناشی از خون‌سرد بودن، محدود بودن آنتی‌بادی‌ها و تا حدی کند بودن تکثیر لنفوسیت‌ها، ایمنی غیراختصاصی بسیار حائز اهمیت است (Whyte، ۲۰۰۷). ایمونوگلوبولین‌ها جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی بوده و به صورت کاملاً تنظیم شده در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌شوند و محافظت سریع و گسترده‌ای را در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کنند. این ویژگی آن‌ها را به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی تبدیل کرده است (Magnadóttir، ۲۰۰۶).

هم‌سو با نتایج این تحقیق (Morand و همکاران، ۱۹۹۹) تزریق لیزوزیم به گربه‌ماهی را عاملی برای افزایش مقدار ایمنوگلوبولین و پروتئین کل بیان کردند و با مشاهده بهبود برخی پارامترهای ایمنی و افزایش خاصیت باکتری‌کشی استفاده از لیزوزیم را فاکتوری اثرگذار در افزایش ایمنی گزارش کردند. در تضاد با نتایج این پژوهش مشاهده شده به‌کارگیری لیزوزیم‌خوراکی در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تاثیری بر افزایش مقدار پروتئین کل سرم نداشته است (Deng و همکاران، ۲۰۱۱). بیش‌ترین بخش پروتئین سرم در کبد سنتز می‌شود که می‌تواند به‌عنوان شاخص عملکرد کبد محسوب شود. کاهش پروتئین کل سرم ویژگی بسیاری از بیماری‌هاست و ممکن است به‌دلیل بیماری کبدی، کاهش جذب یا از دست دادن پروتئین رخ دهد. لذا افزایش مقدار پروتئین کل می‌تواند نشان‌دهنده فعالیت مناسب آنزیم های لیزوزیمی مانند آی ال پی در کبد و سپس ترشح آن درخون باشد (Deng و همکاران، ۲۰۱۱).

عملکردمناسب آنزیم‌های لیزوزیمی‌موید کارایی مناسب سیستم ایمنی در زمان استفاده از لیزوزیم خوراکی در جیره‌غذایی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد که نتایج حاصل از این تحقیق این امر را به اثبات می‌رساند.

براساس‌مطالعات انجام شده استفاده‌و تجویز برخی محرک‌های ایمنی خاص ازجمله آنزیم لایزوزیم جهت جلوگیری از بیماری و تقویت سیستم ایمنی بدن جانور به‌عنوان رژیم کنترلی وجود دارد. با این حال، در حال حاضر پارامترهای وجود دارد که پیش از تجویز روتین این‌ترکیبات‌در آبزی‌پروری،لازم به مطالعه و تحقیق بیش‌تری می‌باشد. بسیاری از این فاکتورها ازجمله: نوع محرک ایمنی، دوز به‌کار رفته، نوع آماده‌سازی و افزودن به جیره، گونه پرورشی و عوامل بیماری‌زا یا بیگانه که محافظت علیه آن‌ها لازم است برقرار شود. در مورد این‌که یک محرک موفق بوده یا نه، یک رژیم تحریکی ایمنی نقش دارد. به‌کارگیری دوز مناسب از محرک ایمنی مورد نظر ضروری می‌باشد چرا که در صورت استفاده از دوزهای نامربوط ممکن است هیچ‌گونه تغییری در سیستم ایمنی آبزی لحاظ نکند، درحالی‌که مقادیر بیش از حد موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌گردد و دوزهای پایین‌تر هیچ تاثیری بر عوامل بیماری‌زا نمی‌گذارد. تغذیه حیوانات با رژیم‌های غذایی که احتیاجات مواد مغذی را برآورده نمی‌کنند نه تنها بر رشدو کارایی غذا تأثیر می‌گذارد، بلکه باعث افزایش حساسیت به بیماری شده و موجب ظهور علائم کمبود، ازجمله تغییر رفتار و ایجاد بستری برای بروز بیماری‌ها می‌شود

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از لایزوزیم خوراکی در جیره‌غذایی کپور ماهیان آزمایشی تاثیر مثبتی بر پارامترهای رشد و ایمنی‌غیراختصاصی(سرم)داشت.نتایج به‌دست‌آمده نشان داد استفاده از لایزوزیم خوراکی به‌میزان ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم در جیره موجب بهبود شاخص‌های رشد و افزایش شاخص‌های ایمنی خونی می‌شود که این یافته موید کارایی بالای لایزوزیم خوراکی بر توان ایمنی‌زایی و بهبود پارامترهای رشد در ماهی کپور معمولی می‌باشد.

منابع

۱. **عادلی، ا.، ۱۳۸۷.** اصول بازاریابی و بسته‌بندی آبزیان. انتشارات هنر تا بی‌نهایت. ۲۰۴ صفحه.

۲. **عامری‌مهابادی، م.، ۱۳۸۷.** روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

۳. **Ai, Q.; Mai, K.; Tan, B.; Xu, W.; Duan, Q.; Ma, H. and Zhang, L., 2006**. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Aquaculture. Vol. 260, pp: 255-263.

۴. **Ashley, P.J., 2007**. Fish welfare: current issues in aquaculture. Appl Anim Behav Sci. Vol. 104, pp: 199-235.

۵. **Balon, E.K., 2006.** The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish culture. Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology. Vol. 11, No. 2, pp: 47-86.

۶. **Bekcan, S.; Dogankaya, L. and Cakirogullari, G.C., 2006.** Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis L.*) fed diets containing different percentages of protein. The Israeli Journal of Aquaculture, Bamidgeh. Vol. 58, No. 2, pp: 137-142.

۷. **Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973.** Routine haematological methods for use with fish blood. Fish Biology banner. Vol. 5, No. 6, pp: 771-781.

۸. **Bondad-Reantaso, M.; Subasinghe, R.P.; Arthur, J.R.; Ogawa, K.; Chinabut, S.; Adlard, R.; Chang, C.S.; Huang, S.L.; Chen, S. and Chen, S.N., 2013**. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, aquaculture. Fish and shellfish immunology. Vol. 35, pp: 115-125.

۹. **Castanon, J.I., 2007**. History of the use of antibiotic as growth promot- ers in European poultry feeds. Poultry Science. Vol. 86, pp: 2466-2471.

۱۰. **Chen, X.; Jiang, S.; Gu, Y. and Shi, Z., 2014**. Molecular characterization and expression of cyp19a gene in Carassius auratus. Journal of Fish Biology. Vol. 85, pp: 516-522.

۱۱. **Cheng, S.; Ma, L. and Zhang, W., 2009** Effects of lysozyme on growth performance of broiler chickens and apparent digestibility coefficients of nutrients. China Feed. Vol. 19, pp: 32–34. (in Chinese)

۱۲. **Deng, J.; Bi, B.; An, Q.; kong, L.; Wang, Q. and Tao, L., 2012**. Effect of dietary inclusion of lysozyme on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquacult. Nutr. Vol. 18, pp: 332-339.

۱۳. **Ding, Y., 2010**. Effects of recombinant lysozyme on growth performance and carcass traits in broilers. J. Anhui Agric. Sci. Vol. 38, pp: 15677-15678.

۱۴. **FAO. 2009.** Press release, 19 June 2009. http://www.fao.org /news/story/en/item/20568/icode/.

۱۵. **FAO. 2014.** Aquaculture Department, The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 243 p.

۱۶. **Gatlin, D.M. and Li, P., 2004**. Dietary supplementation of prebiotics for health management of hybrid stripped bass *morone chrysops* × *M. saxatilis*. Aqua Feeds Formul Beyond. Vol. 1, No. 4, pp: 19-21.

۱۷. **Gu, W. and Zhang, G., 2008**. Effects of lysozyme on growth performance and immune organ index of meat duck. Feed Ind. Vol. 29, pp: 46-48. (in Chinese)

۱۸. **Herbert, P.N.; Bausserman, L.L.; Lynch, K.M.; Saritelli, A.L.; Kantor, M.A. and Nicolosi, R.J., 1987**. apolipoproteins in the *Macaca fascicularis* (cynomolgus) monkey. Homologues of the human C and A Biochemistry. Vol. 10, pp: 1457-1463.

۱۹. **Hevrøy, E.; Espe, M.; Waagbø, R.; Sandnes, K.; Ruud, M. and Hemre, G.I., 2005**. Nutrient utilization in Atlantic salmon *(Salmo salar L*) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition. Vol. 11, pp: 301-313.

۲۰. **Komar, C.M., 2005.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function–implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. Reprod Biol Endocrinol. Vol. 3, 41 p.

۲۱. **Long, Y.; Lin, S.; Zhu, J.; Pang, X.; Fang, Z. and Lin, Y., 2016.** Effects of dietary lysozyme levels on growth performance, intestinal morphology, non-specific immunity and mRNA expression in weanling piglets, Anim. Sci. J. Vol. 87, pp: 411-418.

۲۲. **Lu, Y.; Chen, Z. and Pan, H., 2009**. Effects of lysozyme on the growth performance and immune response of broiler chickens. Feed Res. Vol. 8, pp: 50-52. (in Chinese)

۲۳. **Magnadóttir, B., 2006**. Innate immunity of fish (overview), Fish and shellfish immunology. Vol. 20, pp: 137-151.

۲۴. **Mahious, A.S.; Van Loo, J. and Lieffrig, F., 2007**. Inulin and oligofructose in aquaculture: A review. Aquaculture Europe 2007. October 14-27. pp: 326-327. (Istanbul, Turkey)

۲۵. **Morand, M.; Siwicki, A.; Pozet, F.; Klein, P.; Vinaize, J.C. and Keck, N., 1999**. Effects of dimerized lysozyme (KLP-602) on the cellular and humoral defence mechanism in sheatfish (*Silurus glanis*): in vitro.

۲۶. **Ramanauskiene, K.; Inkeniene, A.M.; Savickas, A.; Masteikova, R. and Brusokas, V., 2009**. Analysis of the

antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. Acta Pol. Pharm. Vol. 66, pp: 681-688.

۲۷. **Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B. and Sasal, P., 2014**. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquacult. Vol. 433, pp: 50-61.

۲۸. **Tacon, A., 1990**. Standards methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp.

۲۹. **Trichet, V.V., 2010**. Nutrition and immunity: an update. Aquaculture Research. Vol. 41, No. 3, pp: 356-372.

۳۰. **Wang, Y., 2009**. Prebiotics: Present and future in food science and technology. Food Research International. Vol. 42, pp: 8-12.

۳۱. **Whyte, S.K., 2007**. The innate immune response of finfish-a review of current knowledge. Fish and Shellfish Immunol. Vol. 23, pp: 1127-1151.

۳۲. **Yeman, M.R. and Yount, N.Y., 2003**. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. Vol. 55, pp: 27-55.

۳۳. **Zar, J., 1994**. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New York. 622 p.

۳۴. **Zhang, X.; Hecker, M.; Park, J.; Tompsett, A.R.; Newsted, J.; Nakayama, K.; Jones, P.D.; Newsted, J.L.; Au, D.W.T.; Kong, R.Y.C.; Wu, R.S.S. and Giesy, J.P., 2008**. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the Japanese medaka. Aquatic Toxicology. Vol. 88, pp: 173-182.

۳۵. **Zhang, Y.A.; Salinas, I.; Li, J.; Parra, D.; Bjork, S.; Xu, Z.; LaPatra, S.E.; Bartholomew, J. and Sunyer, J.O., 2010**. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. Nature Immunology. Vol. 11, pp: 827-835.