بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

اثر پودر کلم بروکلی (*Brassica oleracea var. gemmifera L.*) بر برخی شاخص‌های موکوس ماهی کپور معمولی (*Cyprinous carpio*)

***حمیدرضا نادری فارسانی[۱]، عبدالمجید حاجی‌مرادلو[۲]، وحید تقی‌زاده[۳] و محمدرضا ایمانپور[۴]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، [۲]استاد گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، [۳]استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، [۴]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲٤؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۹

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد) کلم بروکلی (*Brassica oleracea var. gemmifera L*) بر محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی کپور معمولی (*Cyprinous carpio*) انجام شد. در این تحقیق ۳۰۰ ماهی کپور در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ٤۰۰ لیتری (هر مخزن شامل ۲۵ ماهی) با وزن متوسط اولیه ۰/۲٤±۲/۱۱ گرم به‌مدت ۸ هفته به میزان روزانه ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل (TOP) موکوس در تیمار با ۱ درصد کلم بروکلی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد به‌طور معنی‌داری متفاوت بود (P<۰/۰۵). همچنین میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) موکوس نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد از اختلاف معناداری برخوردار بود (P<۰/۰۵). همچنین برای تعیین سطح فعالیت ضدباکتریایی موکوس در پایان دوره، رقابت باکتریایی بین موکوس و ٤ باکتری *Micrococcus luteus, Streptococcus faecium, Serratia marcescenss, Escherichia coli* انجام شد. نتایج این رقابت نشان داد که در تیمار با سطح ۱ درصد کلم بروکلی بیشترین قطر هاله عدم

*مسئول مکاتبه: Hrnaderi68@yahoo.com

رشد هر ٤ گونه باکتریایی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید، با این وجود تفاوت معنی‌داری میان تیمارها وجود نداشت (P>۰/۰۵). به‌نظر می‌رسد، میزان ۱ درصد کلم بروکلی در جیره غذایی کپور معمولی باعث تقویت سیستم ایمنی می‌گردد.

واژگان کلیدی: کلم بروکلی، شاخص‌های موکوس، کپور معمولی

مقدمه

تراکم بیش از حد ماهی در شرایط پرورش، تغذیه نامناسب، استرس‌های بیش‌از حد طی دوره پرورش، فلور باکتریایی آب و ... باعث گردیده است که محیط‌های آبی منبع غنی از باکتری‌های بیماری‌زا شود و به همین دلیل ماهی‌ها نسبت به حیوانات دیگر بیشتر در معرض عفونت باکتریایی قرار گیرند (تروست، ۱۹۸٦). بنابراین، بحث‌های بیماری در صنعت آبزی پروری به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (دکلرک و همکاران، ۲۰۱۳؛ محمد و همکاران، ۲۰۱۳؛ پارک و همکاران، ۲۰۱۲) و تحقیقات زیادی برای رفع این مشکل صورت گرفته است (ساهو و موخرجی، ۲۰۰۲a و ۲۰۰۲b). یکی از مواردی که می‌تواند باعث بهبود این مشکل شود، تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد. ترکیبات سیستم ایمنی غیراختصاصی شامل: موکوس (پوست، آبشش، مخاط روده) و اجزاء تشکیل دهنده خون (سلول‌های فاگوسیتوزکننده و کشنده طبیعی) می‌باشند (یانو، ۱۹۹۷).

موکوس شامل آب و گلیکوپروتئین می‌باشد که بر سطح بدن ماهی قرار دارد و به‌وسیله سلول‌های سطح پوست ماهی ترشح می‌شود (فلتچر، ۱۹۷۸؛ اینگرام، ۱۹۸۰). موکوس به‌عنوان منبعی از شاخص‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی مانند: لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، ایمنوگلبولینها، لکتین، آنزیم‌های پرتئولیتیک و سایر پروتئین‌های ضدباکتریایی و پپتیدها عمل می‌کند (سابرامانین و همکاران، ۲۰۰۷؛ رز و همکاران، ۲۰۰۷؛ یانو و همکاران، ۱۹۹۸).

آلکالین فسفاتازها به‌عنوان عامل انتقال گروه‌های ۳- هیدروکسیل و ۵- فسفات از DNA، RNA، نوکلئوتیدها و گروه‌های فسفات پروتئین‌ها عمل می‌کنند (سادیپول و همکاران، ۲۰۱۲). هر تغییری در فعالیت فسفات‌های قلیایی و اسیدی می‌تواند بر فعالیت متابولیسم بدن ماهی تأثیرگذار باشد. در صنعت شیلات، تغییر در فعالیت فسفاتازها تحت تأثیر عواملی مانند رشد، بیماری، آلودگی و زمان تکثیر مطرح شده است (انان و همکاران، ۲۰۰۲؛ مورا و همکاران، ۲۰۰٤). برای مثال، میزان فعالیت آلکالین

فسفاتازی به‌عنوان یک شاخص از شدت استرس در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmon salar*) بیان شده است (رز و همکاران، ۲۰۰۰).

کارهای زیادی در ارتباط با پروتئین موکوس ماهی صورت گرفته است (ایزی و رز، ۲۰۰۹؛ رجـان و همکاران، ۲۰۱۱). پروتئین‌های ساختار اصلی موکوس ماهی از گلیکوپروتئین‌هایی بـا وزن ملکـولی بالا (106 kDa~) به نام موسین تشکیل شده است (تبـاک، ۱۹۹۵). ابـران در سـال ۱۹۹۹ بیـان کـرد، پروتئین‌های ضدباکتریایی ماهی قادر به نفوذ به درون سلول‌های هدف هستند و می‌توانند به‌عنوان یک سد دفاعی عمل کنند.

همچنین تحقیقات زیادی در ارتباط با تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی صورت گرفته است. بعضی از این مطالعات تأثیر پروبیوتیک‌ها (سون و همکاران، ۲۰۰۹؛ نیاک، ۲۰۱۰؛ شریفزمان و آستین، ۲۰۰۹)، ویتامین‌ها (ساهو و موخرجی، ۲۰۰۲a و ۲۰۰۲b؛ آی و همکاران؛ ۲۰۰۶)، گیاهان دارویی (وین و همکاران، ۲۰۰۹؛ گالیناو همکاران، ۲۰۰۹؛ لی و همکاران، ۲۰۰۹) و ... را در افزایش ایمنی بدن مورد بررسی قرار داده‌اند. اما امروزه داروهای گیاهی و طبیعی به‌دلیل عواملی چون ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط‌زیست، کم بودن عوارض جانبی آن‌ها در مقایسه با داروهای شیمیایی و ... منجرشده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردارباشند (قاسمی پیر بلوطی، ۲۰۰۹). از سوی دیگر افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تخریب و تهدید محیط‌زیست به‌خصوص در مواقعی که آنتی‌بیوتیک‌ها به آب‌های سطحی راه می‌یابند و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی‌ترین تهدیدات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (هریکریشینان و همکاران، ۲۰۰۳؛ ایواما و ناکانیشی، ۱۹۹۶).

یکی از گیاهانی که به‌دلیل داشتن مقادیر بالایی از مواد معدنی، آلی و ویتامین‌ها ارزش دارویی بالایی دارد، گیاه کلم بروکلی[1] می‌باشد. ترکیبات کلم بروکلی شامل رطوبت، نیتروژن، اسیدهای آمینه (آرژنین، سیستئین، متیونین، هیستدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، فنیل‌آلانین، تیروزین، ترئونین، تریپتوفان، والین)، چربی، فیبر، خاکستر، سیلیسیم، بور، سولفور، کلسیم، فسفر، سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلر، فلور، برم، ید، روی، آلومینیوم، منگنز، آهن، مس، مولیبدین، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن، سلنیوم،

1- Brassica oleracea var. gemmifera L.

تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پیریدوکسین، کلسیم پانتوتنیک، اسیدفولیک، بیوتین، کولین کلراید و اینوزیتول می‌باشد (کالووی و مانسون، ۱۹٦۱). این گیاه هم چنین دارای مقدار زیادی فیبر، کاروتنوئید، کلسیم، گلوکوزینولات، فلاوونوئید، سلنیوم و ویتامین‌های A، K، C، E و B_1 است (بروسکی و همکاران، ۲۰۰۸، جفری و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۹؛ مورنو و همکاران، ۲۰۰٦). تحقیقات نشان می‌دهند که میزان بهره‌برداری کلسیم کلم را می‌توان با کلسیم شیر مقایسه کرد (فینکه و شرمن، ۱۹۳۵؛ کونگ و همکاران، ۱۹۳۹؛ کآو و همکاران، ۱۹۳۸). آزمایش‌های دیگر بیان می‌کنند که کلم بروکلی یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد (کوسکیوارا و همکاران، ۱۹۹۱؛ یوک مان لی، ۲۰۰۸). همچنین کلم بروکلی را می‌توان به‌عنوان منبعی سرشار از کلروفیل و پروتئین معرفی کرد (مونیروزمان و همکاران، ۲۰۰۷).

با توجه به منابع در دسترس تاکنون تحقیقی در ارتباط با تأثیر کلم بروکلی در سیستم ایمنی ماهی انجام نشده است، اما تحقیقات نشان می‌دهند که وجود سلنیوم، کلسیم، روی، نیاسین، ویتامین‌های A، K، C، E، B_1 و ... به‌صورت جداگانه باعث بهبود سیستم ایمنی ماهی می‌شود (هامره، ۲۰۱۱؛ ژوو و همکاران، ۲۰۱۲؛ فرینکیک و ابرینگر، ۲۰۰۳؛ علی‌شاهی و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین این پژوهش به منظور بررسی اثر کلم بروکلی بر فاکتورهای پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز و فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی کپور معمولی صورت گرفته است.

مواد و روش کار

تهیه ماهی: ماهی کپور معمولی از مرکز تکثیر وپرورش ماهی کلمه سیجوال در استان گلستان تهیه و به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد. تعداد ۳۰۰ ماهی کپور در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ٤۰۰ لیتری (هر تانک شامل ۲۵ ماهی) با وزن متوسط ۲/۱۱±۰/۲٤ گرم به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. شرایط محیطی در طول آزمایش تقریباً یکسان بود (دما ۲٤/۸۲±۰/٤۸ درجه سانتی‌گراد؛ پی اچ ۸/٦۵±۰/۰۸؛ هدایت الکتریکی ٤۵٦/۷۵±۵٦/۷۳ میکروزیمنس؛ شوری ۰/۱٤±۰/۰۵ پی پی تی و اکسیژن ۷–۸ پی پی ام).

تهیه غذا: با توجه به کارهای انجام شده (وین و همکاران، ۲۰۰۹؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۸) در ارتباط با غلظت مؤثر گیاهان دارویی در ارتباط با بهبود شاخص‌های فاکتورهای سیستم ایمنی، رشد و پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی، در این تحقیق چهار جیره غذایی با سطوح ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد از کلم بروکلی تهیه گردید. ابتدا کلم بروکلی از مراکز فروش سبزیجات در شهرستان گرگان

تهیه شد. سپس کلم بروکلی به‌وسیله مخروط‌کن برقی خرد شد و در انکوباتور در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد تا رطوبت کاهش یابد. سپس از اتکوباتور خارج شد و در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر کلم بروکلی به میزان ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (گرم در صد گرم غذا) با ژلاتین ۳ درصد (گرم در ۱۰۰ سی‌سی آب) مخلوط شد و سپس بر جیره غذایی اسپری گردید. در انتها غذا در انکوباتور در دمای ۳۰-٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود و پس از آن در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و علامت‌گذاری شد و تا زمان استفاده در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. غذادهی روزانه ۲ نوبت و به‌میزان ۳ درصد وزن بدن صورت گرفت.

نمونه‌برداری موکوس: ابتدا ماهی به وسیله عصاره گل میخک با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند (اخلاقی و میراب بروجردی، ۱۹۹۸). همچنین برای کاهش احتمال اثرات تغذیه بر وضعیت متابولیسم، غذادهی به ماهی در ٢٤ ساعت قبل از نمونه‌گیری قطع شد. جمع‌آوری موکوس بر مبنای شیوه سابرامانیان و همکاران (۲۰۰۷) با کمی اصلاحات انجام شد. از هرتیمار ۲۰ عدد ماهی به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شد. پس از مشاهده وضعیت عمومی هر ماهی و اطمینان از سالم بودن آن، موکوس هر ۲۰ ماهی به‌صورت مخلوط با هم جمع‌آوری شد. برای شستشوی موکوس از سطح پوست و جمع‌آوری آن، ۵ ماهی از هر تیمار درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۵ میلی‌لیتر سدیم‌کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. کیسه‌ها به آرامی به‌مدت ۲-۱ دقیقه همزده شد تا فرصت کافی برای روان شدن موکوس وجود داشته باشد. بدین ترتیب موکوس تازه به‌دست آمد، سپس ماهیان از زیپ پلاست خارج شده و درون آب پراکسیژن قرار گرفتند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس نمونه‌های موکوس به آزمایشگاه منتقل و با دستگاه سانتروفیوژ (5810, R eppendrof centrifuge digital) و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سوپرنتانت حاصل به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل و برچسب‌زنی شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

اندازه‌گیری پروتئین محلول و آلکالین فسفاتاز موکوس: اندازه‌گیری پروتئین بر اساس روش لوری انجام شد (لوری و همکاران، ۱۹۵۱). ابتدا محلول‌های D، E (معرف رنگی فولین به نسبت ۱:۱ با آب‌مقطر) و آلبومین سرم گاوی (به نسبت ۱:۱ با آب‌مقطر) ساخته شد.

٤ لوله آزمایش برای استاندارد، یک لوله آزمایش برای نمونه و یک لوله آزمایش برای شاهد در نظر گرفته شد. ابتدا به لوله شاهد ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه شد. سپس به لوله‌های استاندارد به‌ترتیب ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد آلبومین سرم گاوی اضافه و تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر با آب‌مقطر رقیق شد. به لوله نمونه نیز ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده با آب‌مقطر سرد اضافه گردید. سپس به هر کدام از لوله‌های شاهد، استاندارد و نمونه ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر اضافه شد. بعد ۲ میلی‌لیتر از محلول D به لوله‌ها اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول E اضافه گردید. محتویات لوله آزمایش به خوبی مخلوط شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در یک محیط تاریک قرار گرفت. پس از این مدت جذب نمونه‌ها به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس یک منحنی استاندارد با استفاده از جذب نوری به‌دست آمده از لوله‌ها مربوط به استاندارد آلبومین سرم گاوی (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) رسم گردید. جذب نوری به‌دست آمده از نمونه‌ها به منحنی استاندارد منتقل شده و میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

اما برای اندازه‌گیری فاکتور آلکالین فسفاتاز (ALP) به‌وسیله کیت‌های استاندارد ساخت شرکت پارس آزمون انجام گردید.

بررسی خواص ضدباکتریایی: پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع و تهیه استوک، به‌منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی موکوس، با استفاده از روش انتشار دیسک زیر هود میکروبی از تمام سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۰/۲۳\times۱۰^{۸}$ در ۱/۵ میلی‌لیتر تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده، بر سطح محیط کشت آگار کشت یکنواخت انجام شد. نمونه‌های موکوس از قبل از فریزر خارج و در دمای اتاق یخ‌زدایی شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر موکوس از هر تیمار درون چاهک ۹٦ خانه ریخته و دیسک‌های بلانک استریل، درون چاهک‌ها قرار گرفت و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا موکوس به خوبی جذب دیسک‌ها شود. آنگاه دیسک‌های بلانک به کمک پنس با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت آگار که از قبل علامت‌گذاری شده بودند قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن نتایج فعالیت ضدباکتریایی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها ثبت شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سویه باکتری ٤ بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و با روش One-way

ANOVA انجام شد. اختلاف معناداری بین گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت و برای تعیین اختلاف معناداری بین گروه‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شد.

نتایج

پروتئین: نتایج بررسی میزان پروتئین کل موکوس در جدول ۱ بیان شده است. نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل موکوس در تیمار تغذیه شده با ۱ درصد از کلم بروکلی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین میزان پروتئین کل در تیمار ۰/۵ درصد نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود اما تفاوت معناداری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). همچنین کمترین میزان پروتئین کل در تیمار ۰/۲ درصد به‌دست آمد.

آلکالین فسفاتاز: نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان آلکالین فسفاتاز در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان آلکالین فسفاتاز در تیمار تغذیه شده با ۱ درصد از کلم بروکلی به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از تیمارهای دیگر و گروه شاهد بود. همچنین میزان آلکالین فسفاتاز در تیمار ۰/۵ درصد از کلم بروکلی نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود ولی این میزان معنادار نبود (P>۰/۰۵). از سوی دیگر، کمترین میزان اندازه‌گیری شده آلکالین فسفاتاز در تیمار با ۰/۲ درصد کلم بروکلی ثبت شد.

جدول ۱- مقادیر اندازه‌گیری پروتئین کل و آلکالین فسفاتاز موکوس بر حسب میانگین± انحراف معیار.

	۰	۰/۲	۰/۵	۱
پروتئین کل (mg/ml)	۱۶/۶۹±۳/۶۱^{a}	۱۴/۶۶±۰/۷۰^{a}	۱۷/۷۱±۶/۰۹^{a}	۲۸/۲۷±۳/۵۳^{b}
آلکالین فسفاتاز (international unite/litter)	۶/۸۷ E^{2}±۲۹/۶۲^{a}	۶/۸۰E^{2}±۴۴/۴۲^{a}	۷/۰۳E^{2}±۱۰/۷۳^{ab}	۷/۷۲E^{2}±۱۱/۷۳^{b}

- میزان E در جدول برابر با ۱۰ می‌باشد.
- پروتئین کل (mg/ml) TOP، آلکالین فسفاتاز (international unit/Litter) ALP
- حروف مشابه در سطرها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد.

خواص ضدباکتریایی: مقادیر به‌دست آمده از بررسی خواص ضدباکتریایی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد باکتریایی در تیمار تغذیه شده با ۱ درصد از کلم بروکلی در هر ٤ رقابت باکتریایی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد بیشتر بود اما این

میزان به‌صورت معنادار نبود (P>۰/۰۵). همچنین این میزان در تیمار ۰/۵ درصد در سه رقابت باکتریایی با *Micrococcus luteus*، *Streptococcus faecium* و *Escherichia coli* نسبت به گروه شاهد بیشتر بود اما این میزان به‌صورت معنادار نبود (P>۰/۰۵). به‌علاوه، میزان قطر هاله عدم رشد در تیمار ۰/۲ درصد در دو رقابت باکتریایی با *M. luteus* و *E. coli* نسبت به گروه شاهد بیشتر بود اما صورت معنادار مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول ۲- مقادیر قطر هاله عدم رشد در رقابت باکتریایی بین تیمارها و گروه شاهد.

	۰	۰/۲	۰/۵	۱
Micrococcus luteus	۰/۸۳±۰/۱۲^{a}	۰/۹۳±۰/۱۸^{a}	۰/۹۶±۰/۳۳^{a}	۰/۹۱±۰/۲۰^{a}
Streptococcus faecium	۱/۰۵±۰/۱۷^{a}	۱/۰۳±۰/۲۲^{a}	۱/۰۵±۰/۱۸^{a}	۱/۱۰±۰/۲۲^{a}
Serratia marcescenss	۰/۹۵±۰/۳۱^{a}	۰/۹٤±۰/۱۸^{a}	۰/۸٤±۰/۱۸^{a}	۱/۰۱±۰/۲۲^{a}
Escherichia coli	۱/۰۰±۰/۱۵^{a}	۱/۱۳±۰/۱۲^{a}	۱/۰۲±۰/۲۲^{a}	۱/۱۳±۰/۱۹^{a}

- مقادیر در جدول بر حسب سانتی‌متر و با دقت ۰/۰۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.
- حروف مشابه در سطرها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در پارامترهای مذکور می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های انجام شده تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با اثر کلم بروکلی بر سیستم ایمنی در ماهی‌ها مشاهده نگردید؛ اما تحقیقات زیادی درارتباط با اثر کلم بروکلی بر سیستم ایمنی انسان و موجودات دیگر (کوهن و همکاران، ۲۰۰۰؛ آمبرسون و همکاران، ۲۰۰٤؛ کریستین و همکاران، ۲۰۰٤؛ جوسف و همکاران، ۲۰۰٤) و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در صنایع غذایی صورت گرفته است (بروسکی و همکاران، ۲۰۰۸). این مطالعه برای بررسی اثر سطوح مختلف کلم بروکلی (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد) بر پارامترهای پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز و خاصیت ضدباکتریایی موکوس ماهی کپور معمولی برای مطالعه اثر این گیاه بر سلامتی ماهی انجام گردید.

بر اساس جدول‌های ۱ و ۲ نتایج نشان داد، که با افزایش بیش از ۰/۲ درصد کلم بروکلی در جیره غذایی میزان غلظت کل پروتئین و آلکالین فسفاتاز موکوس و همچنین خاصیت ضدباکتریایی موکوس ماهی افزایش می‌یابد. مطالعات مختلف در ارتباط با وجود مواد آلی (اسیدآمینه، اسیدهای چرب، فیبر)، مواد معدنی (کلسیم، سلنیوم، فسفر، پتاسیم، سدیم)، ویتامین‌ها (A, K, E, B, C) و ... اثر مثبت این

مواد بر سیستم ایمنی ماهی را تأیید می‌کند که در گیاه کلم بروکلی وجـود دارد (جلالـی و همکـاران، ۲۰۰۸؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژوو و همکاران، ۲۰۱۲).

برای مثال، سلنیوم به‌عنوان یک ریز مغذی ضروری در جیره غذایی ماهی عمل می‌کند و می‌توانـد باعث بهبود وظایف سیستم ایمنی گردد (بک و همکاران، ۱۹۹۵a، ۱۹۹۵b؛ لی و شیائو، ۲۰۰۵؛ لورنتزن و همکاران، ۱۹۹٤). به‌علاوه در تحقیقات دیگر روی سایر حیوانات بیان شده است که، سلنیوم باعـث بهبود رشد، تکامل، مقاومت نسبت به عفونت‌ها و سیستم ایمنی می‌گـردد (پوفـام و همکـاران، ۲۰۰۵؛ زنگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ وانگر، ۲۰۰٤؛ هینتز و همکاران، ۲۰۰۱؛ بـک و همکـاران، ۲۰۰٤). همچنـین تحقیقات دیگر نشان می‌دهند که بهبود شاخص‌های رشد و پاسخ‌های سیستم ایمنی در ماهی بـه‌طـور مستقیمی به وجود مکمل‌هایی مانند ویتامین E (هاردی و همکاران، ۱۹۹۰؛ ابـاچ و همکـاران، ۱۹۹۳؛ بلیزر و وولـک، ۱۹۸٤)، ویتـامین A (تامسـون و همکـاران، ۱۹۹٤)، ویتـامین C (لـی و لاول، ۱۹۸۵؛ هاردی و همکاران، ۱۹۹۱؛ ورلاک و همکاران، ۱۹۹۳)، فیبر (گراهام و همکاران، ۱۹۸۸)، کولین کلراید و کلسیم پانتوتنات (یانو و همکاران، ۱۹۸۸)، روی و مـس (لـی و شـیائو، ۲۰۰۲؛ شـیائوو و جیانـگ، ۲۰۰٦) در جیره غذایی وابسته است. با توجه به‌این تحقیقات، دلیل افزایش میزان فاکتورهـای سیسـتم ایمنی (پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز و خاصیت ضـد باکتریـایی موکـوس) در تیمارهـای دارای جیـره غذایی با سطوح بالای کلم بروکلی را تأیید می‌کنند.

به‌نظر می‌رسد که اضافه کردن ۱ درصد کلم بروکلی به جیره غذایی مـاهی کپـور معمـولی، باعـث بهبود شاخص‌های موکوس و در نهایت باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از جناب آقای مهندس علی جافر، مهندس کشیری، مهندس نعیمی مسـئولین محتـرم آزمایشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و سایر دوستانی که در این پروژه همکاری نموده‌انـد تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Anan, Y., Kunito, T., Ikemoto, T., Kubota, R., Wanatabe, I., Tanabe, S., Miyazaki, N., and Petrov, E.A. 2002. Elevated concentrations of trace elements in Caspian seals (*Phoca caspic*a) found stranded during the mass mortality events in 2000. Arch Environ Contam Toxicol. 42: 354-362.
2. Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H., and Liufu, Z. 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth and immunity of large yellow croaker, Pseudosciaena crocea. Aquaculture. 261: 327-336.
3. Ambrosone, C.B., McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Zhang, Y., and Shields, P.G. 2004. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. Journal of Nutrition. 134: 1134–8.
4. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F., and Elsabee, M.Z. 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers. 86(1): 142-146.
5. Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E.J., Ciska, E., and Zielinski, H. 2008. content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*brassica oleracea*). Eur Food Res Technol. 226: 459-465.
6. Blazer, V.S., and Wolke, R.E. 1984. The effects of α-tocoferol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture. 37: 1–9.
7. Beck, M., Kolbeck, P., Rohr, L., Shi, Q., Morris, V., and Levander, O. 1995a. Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. Journal of Medical Virology. 43: 166–170.
8. Beck, M., Shi, Q., Morris, V., and Levander, O. 1995b. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium deficient mice results in selection of identical virulent isolates. Nature Medicin*e*. 1: 433–441.
9. Beck, M.A., Handy, J., and Levander, O.A. 2004. Host nutritional status: the neglected virulence factor. Trends Microbiol. 12: 417-423.
10. Calloway, D.H., and Munson, A.H. 1961. Response of cereal-fed guinea pigs to dietary broccoli supplementation and x-irradiation. Journal of Nutrition. 73: 191.
11. Cohen, J.H., Kristal, A.R., and Stanford, J.L. 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. Journal *of the* National Cancer. 92: 61–68.
12. Christine, O., Ambrosone, C.B., Susan, E., McCann, S.E., Freudenheim, J.L., and James, R. 2004. Breast Cancer Risk in Premenopausal Women Is Inversely Associated with Consumption of Broccoli, a Source of Isothiocyanates, but Is Not Modified by GST Genotype. The Journal of Nutrition. 134: 1134–1138.
13. Declercq, A.M., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P., and

Decostere, A. 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Veterinary research. 44(1): 27-32.
14. Easy, R.H., and Ross, N.W. 2009. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 4(3): 159-167.
15. Fletcher, T.C. 1978. Defence mechanisms in fish.Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology. 2: 189–222.
16. Fincke, M.L., and Sherman, H.C. 1935. The availability of calcium from some typical foods The Journal of Biological Chemistry. 110: 421-428.
17. Ferenčík, M., and Ebringer, L. 2003. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. Folia microbiologica. 48(3): 417-426.
18. Galina, J., Yin, G., Ardó, L., and Jeney, Z. 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. Fish physiology and biochemistry. 35(4): 669-676.
19. Ghasemi Pirbalouti, E. 2009. Survey and recognition of the medicine and aromatic plants. The Press of Islamic Azad University, 500p.
20. Graham, H., Löwgren, W., Pettersson, D., and Åm, P. 1988. Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley pollard based pig diet. Journal of Nutrition. 38(5): 1073-1079.
21. Hamre, K. 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. Aquaculture Nutrition. 17(1): 98-115.
22. Harikrishnan, R., Nisha, M.R., and Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41-50.
23. Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1990. The effect of vitamin E on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 87: 1–13.
24. Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1991. The effect od dietary vitamin C on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 95: 201–214.
25. Hintze, K.J., Lardy, G.P., Marchello, M.J., and Finley, J.W. 2001. Areas with high concentrations of Se in the soil and forge produce beef with enhanced concentrations of Se. Journal of Agric Food Chem. 49: 1062-1067.
26. Ingram, G.I. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review. Journal of Fish Biological. 16: 23–60.
27. Iwama, G., and Nakanishi, T. 1996. Innate immunity in fish. The Fish Immune System. Academic Press, London, UK. 73-114.
28. Jalali., M.A., Hosseini, S.A., and Imanpour, M.R. 2008. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid-enriched Artemia urmiana on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. Aquaculture Research. 39(12): 1286-1291.

29. Jeffery, E.H., and Araya, M. 2009. Physiological effects of broccoli. Phytochemical Reviews. 8: 283-298.
30. Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheski, N., Klein, B.P., and Juvik, J.A. 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli, Journal of Food Composition and Analysis. 16: 323–330.
31. Joseph, M.A., Moysich, K.B., Freudenheim, J.L., Shields, P.G., Bowman, E.D., Zhang, Y., Marshall, J.R., and Ambrosone, C.B. 2004. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione s-transferases m1 and t1, and prostate cancer risk. Journal *of the* National Cancer. 50: 206–13.
32. Koskivaara, M., Tellervo, EV., and Prost, M. 1991. Seasonal occurrence of gyrodactylid monogeneans on the roach (*Rutilus rutilus*) and variations between four lakes of differing water quality in Finland. Aqua Fenn. 21: 47-55.
33. Kao, H.C., Connerandh, R.T., and Sherman, C. 1938. The availability of calcium from Chinese cabbage (*Brassica pekinensis. Rupr.*). The Journal of Biological Chemistry. 123: 221-228.
34. Kung, L.C., Yeh, H.L., and Adolph, W.H. 1938. The availability of calcium in vegetable food materials. Chinese Journal of Physiol. 13: 307-316.
35. Li, R., W., Chen, W., Wang, W., and Zhang, X. 2009. Extraction, characterization of Astragalus polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. Carbohydrate Polymers. 78(4): 738-742.
36. Li, Y., and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. Journal of Nutrition. 115: 123–131.
37. Lee, M.H., and Shiau, S.Y. 2002. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, Penaeus monodon, and effects on non-specific immune responses. Fish Shellfish Immunol. 13: 259-270.
38. Lorentzen, M., Maage A., and Julshamn, K. 1994. Effects of dietary selenite or selenomethioneine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 121: 359-367.
39. Mohammed, H., Olivares-Fuster, O., LaFrentz, S., and Arias, C.R. 2013. New attenuated vaccine against columnaris disease in fish: Choosing the right parental strain is critical for vaccine efficacy. Vaccine. 31(45): 5276-5280.
40. Mora, S.D., Sheikholeslami, M.R., Wyse, E., Azemard, S., and Cassi, R. 2004. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea. Mar Pollut Bull. 48: 61-77.
41. Moreno, D.A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., and García-Viguera, C. 2006. Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1508-1522.
42. Moniruzzaman, M., Rahman, S.M.L., Kibria, M., Grahman, M.A., and Hossain, M.M. 2007. Effect of boron and nitrogen on yield and hollow stem of broccoli. Journal of Soil Nature. 1(3): 24-29.
43. Obach, A., Quentel, C., and Baudin Laurencin, F. 1993. Effects of alpha-

tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Disese of Aquat. Organ. 13: 175–185.
44. Park, S.B., Aoki, T., and Jung, T.S. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing Edwardsiella tarda infection in fish. Veterinary research. 43(1): 1-11.
45. Rajan, B., Fernandes, J.M., Caipang, C., Kiron, V., Rombout, J.H., and Brinchmann, M.F. 2011. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. Fish and Shellfish Immunology. 31(2): 224-231.
46. Ross, N., Subramanian, S., and MacKinnon, S. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology. 148(2): 256–263.
47. Sitdhipol, J., Niwasabutra, K., Wannissorn, B., Visessanguan, W., and Tanasupawat, S. 2012. Characterization of Alkaline Phosphatase Producing Bacteria Isolated from Thai Fermented Fish Products. International Journal of Biology. 4(3): 44.
48. Subramanian, S., MacKinnon, S.L., and Ross, V.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 148(3): 256-263.
49. Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology. 29: 2-14.
50. Popham, H.J.R., Shelby, K.S., and Popham, T.W. 2005. Effect of dietary Se supplementation on resistance to baculovirus infection. Biological Control. 32: 419-426.
51. Sharifuzzaman, S.M., and Austin, B. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish Shellfish Immunol. 27: 440-445.
52. Son, V.M., Changa, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, C.H., and Cheng, W. 2009. Dietary administration of the probiotic, Lactobacillus plantarum, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides. Fish Shellfish Immunol. 26: 691-698.
53. Sahoo, P.K., and Mukherjee, S.C. 2002a. Influence of high dietary *a-tocopherol* intakes on specific immune response, non-specific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture Nutrition. 8: 159-167.
54. Sahoo, P.K., and Mukherjee, S.C. 2002b. The e!ect of dietary glucan, levamisole, ascorbic acid and a-tocopherol on disease resistance and non-specific immunity level in *aflatoxin B1-induced* immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). In: The Fifth Indian Fisheries Forum Proceedings (ed. by S. Ayyappan, J.K. Jena and M. Mohan Joseph). pp. 119-126. AFSIB Mangalore and AoA, Bhubaneswar, India.

55. Tabak, L.A. 1995. In defense of the oral cavity: structure biosynthesis and function of salivary mucins. Annu. Rev. *The* Journal of Physiology. 57: 547–564.
56. Thompson, I., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F., and Secombes, C.J. 1994. The effect of dietary vitamin A on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem. 12: 513–523.
57. Trust, T.J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish." Annual Reviews in Microbiology. 40(1): 479-502.
58. Verlhac, V., N'doye, A., Gabaudan, J., Troutaud, D., and Deschaux, P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In Fish Nutrition in Practice.
59. Yano, T. 1997. 3 The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. Fish Physiology. 15: 105-157.
60. Yano, T., Nakao, M., Furuichi, M., and Yone, Y. 1988. Effects of dietary choline, pantothenic acid and vitamin C on the serum complement activity of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 54: 141–144.
61. Yin, G., Ardo, L., Thompson, K., Adams, A., Jeney, Z., and Jeney, G. 2009. Chinese herbs (Astragalus radix and Ganoderma lucidum) enhance immune response of carp (Cyprinus carpio), and protection against Aeromonas hydrophila. Fish and Shellfish Immunology. 26(1): 140-145.
62. Whanger, P.D. 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. Br Journal of Nutrition. 91: 11-28.
63. Zeng, H., and Combs Jr, G.F. 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. Journal Nutrition of Biochem. 19: 1-7.
64. Zhong, Y., Lall, S.P., and Shahidi, F. 2008. Effects of dietary oxidized oil and vitamin E on the growth, blood parameters and body composition of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* (Linnaeus 1758)." Aquaculture Research. 39(15): 1647-1657.
65. Zhou, Q., Wang, L., Wang, H., Xie, F., and Wang, T. 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Fish and shellfish immunology. 32(6): 969-975.