بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هشتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۸
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.15268.1446

مقایسه شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استخرهای آب شور با آب شیرین

***سید مرتضی حسینی[۱]، عبدالوهاب کر[۲]، بهروز قره‌وی[۱] و یوسف ایری[۱]**

[۱]استادیار پژوهشی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان، [۲]کارشناس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۲

چکیده

هدف از این تحقیق مقایسه وضعیت ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استخرهای خاکی آب شور در سایت پرورش میگوی گمیشان و حوضچه‌های فایبرگلاس آب شیرین بود. به‌این منظور ۱۰۰۰ قطعه ماهی در استخر خاکی سه هکتاری و ۱۵۰ قطعه ماهی در سه حوضچه فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند و پس از ۳ ماه پرورش، نمونه خون از آن‌ها گرفته شد. مقایسه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نشان داد که اختلاف معنی‌داری در دما، اکسیژن محلول و pH آب بین استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس وجود نداشت ($P>0/05$) ولی شوری و آمونیاک آب استخر خاکی به‌طور معنی‌داری بالاتر از حضچه‌های آب شیرین بود ($P<0/05$). همچنین، پروتئین کل، گلبولین، لیزوزیم، کمپلمان و توتال ایمنوگلبولین سرم در ماهیان استخر خاکی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان حوضچه‌های فایبرگلاس بود ($P<0/05$). اختلاف معنی‌داری در مقدار آلبومین سرم بین دو تیمار وجود نداشت ($P>0/05$). این نتایج نشان می‌دهد که ماهی‌های پرورش یافته در استخر خاکی از ایمنی پایین‌تری نسبت به ماهیان پرورش یافته در آب شیرین برخوردارند که می‌تواند به‌دلیل شوری و آمونیاک آب باشد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلا، استخر خاکی، ایمنی، آب شور

مقدمه

شاخص‌های خونی ماهیان ابزار مناسبی جهت بررسی وضعیت سلامت و ایمنی می‌باشند. لیزوزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های ضدباکتری در ایمنی ذاتی علیه عوامل عفونی می‌باشد (ساوراب و ساهو، ۲۰۰۸). لیزوزیم در طیف وسیعی از مهره‌داران از جمله ماهیان و نیز سخت پوستان وجود دارد و از آن به‌عنوان عامل ضدباکتری نام می‌برند. لیزوزیم که توسط گلبول‌های سفید منتشر در بافت‌های مختلف و گردش خون ترشح می‌شود، در موکوس، سرم خون و تخمک ماهیان یافت می‌شود. به‌علاوه لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌های خونی نیز حاوی لیزوزیم هستند. لیزوزیم قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی لایه

*مسئول مکاتبه: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com

پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت است. باکتری‌های گرم منفی به‌طور مستقیم تحت تأثیر لیزوزیم قرار نمی‌گیرند. لیزوزیم تنها در صورتی‌که کمپلمان‌ها و سایر آنزیم‌ها باعث حذف لایه خارجی باکتری‌های گرم منفی شوند با تأثیر بر لایه پپتیدوگلیکانی باکتری‌ها باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند (ساوراب و ساهو، ۲۰۰۸). مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی بر میزان و نیز قدرت ضد باکتریایی لیزوزیم بافت‌های مختلف ماهیان تأثیرگذار است، که از آن جمله می‌توان به عوامل کیفی آب به‌ویژه درجه حرارت، تغذیه، و عوامل استرس‌زا اشاره کرد (سلطانی، ۱۳۸۷).

کمپلمان در پاسخ ایمنی غیر اختصاصی به یک ترکیب می‌تواند اثر مؤثر مستقیمی مانند کشتن پاتوژن به وسیله لایز کردن آن داشته باشد (الیس، ۱۹۹۹). سیستم کمپلمان از تعداد اجزای پروتئینی موجود در سرم تشکیل شده است (سلطانی، ۱۳۸۷). فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم به‌عنوان عملکردی از فعالیت کمپلمان از طریق مسیر فرعی در نظر گرفته می‌شود و ثابت شده است که برخی تفاوت‌ها بین پستانداران و ماهیان استخوانی نشان دهنده اهمیت بیشتر مسیر فرعی در پاسخ ایمنی ذاتی ماهیان استخوانی در مقایسه با پستانداران است (وایت، ۲۰۰۷).

بخشی از ایمنی اکتسابی ماهیان به‌وسیله ایمنوگلوبولین‌ها ایجاد می‌شود که توسط لنفوسیت‌های B ترشح می‌شوند (شرودر و همکاران، ۱۹۹۸). ایمنوگلوبولین‌ها نقش مهمی را در ایمنی هومورال ایفا می‌کنند. ایمنوگلوبولین اصلی ماهیان که عمل ضد باکتریایی و ویروسی مشابه حیوانات عالی دارد، IgM می‌باشد (سلطانی، ۱۳۸۷). اندازه‌گیری IgM نیاز به روش‌های اختصاصی برای هرگونه دارد اما اندازه‌گیری ایمنوگلبولین کل سرم ساده و سریع است؛ لذا از این روش در تحقیقات زیادی استفاده شده است.

شرایط محیطی، بر سلامت و ایمنی ماهی تأثیر دارند (ماکرینوس و بودن، ۲۰۱۶). لذا، وقتی ماهی در شرایط جدیدی پرورش می‌یابد، ضروریست که سلامت و ایمنی آن در محیط جدید ارزیابی شود. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که عوامل محیطی مختلف مثل درجه حرارت، کیفیت آب و شوری بر ایمنی ماهی تأثیر می‌گذارند (ماگنادوتیر، ۲۰۱۰؛ واتس و همکاران، ۲۰۰۱؛ بودن، ۲۰۰۸). استخرهای گمیشان به‌عنوان محیط پرورشی جدید، تفاوت زیادی با شرایط معمول پرورش قزل‌آلا در استخرهای بتنی دارند. استخرهای گمیشان دارای آب شور هستند، تعویض آب ندارند، مواد معلق در آب زیادی دارند، به‌دلیل بستر خاکی، طیف وسیعی از موجودات در این استخرها زندگی می‌کنند که می‌توانند به‌عنوان غذا یا انگل ماهی مطرح باشند. لذا، وضعیت سلامت ماهیان در این استخرها متفاوت از چیزیست که در استخرهای بتنی دیده می‌شود. لذا این تحقیق قصد داشت به مقایسه شاخص‌های ایمنی سرمی ماهیان قزل‌آلا پرورش یافته در استخرهای خاکی گمیشان و ماهیان پرورشی در آب شیرین بپردازد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از یک استخر سه هکتاری واقع در سایت گمیشان از دی تا اسفند ماه استفاده شد. تعداد ۱۰۰۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در استخر ذخیره شده و روزانه ۳ درصد غذادهی گردیدند. همچنین، با توجه به این‌که برای مطالعات خون ماهیان به یک گروه شاهد نیاز است، ماهیان پرورشی در آب شیرین در ۳ حضوچه فایبرگلاس (۲۰۰۰ لیتری) واقع در ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره سو به‌عنوان شاهد استفاده شدند. ماهی ها با تراکم ۵۰ ماهی در هر

مخزن ذخیره شدند و جریان آب به‌طور مداوم برقرار بود (۰/۳ لیتر در دقیه به ازای هر کیلوگرم ماهی). غذادهی این ماهیان مشابه ماهیان استخر خاکی انجام شد (غذای GFT1 شرکت فرادانه). در زمان خونگیری، وزن ماهیان استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس حدود ۳۰۰ گرم بود. خونگیری از آب شور و شیرین همزمان انجام شد. برای نمونه‌برداری از استخر، تعداد ۱۲ ماهی توسط سالیک صید شده و توسط یوجینول (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بیهوش شدند. برای نمونه‌گیری از حوضچه فایبرگلاس از ساچوک استفاده شد. پس از بیهوشی، نمونه خون از ساقه دم با استفاده از سرنگ غیر هپارینه گرفته شد. نمونه‌های خون برای تهیه سرم و مطالعات سرولوژیک استفاده شدند. سرم پس از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه (با سرعت g۱۰۰۰) جدا و در دمای منهای بیست درجه نگهداری شد (حسینی و ترخانی، ۲۰۱۳).

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم سرم به روش کدورت‌سنجی انجام شد (الیس، ۱۹۹۰). به‌این منظور از باکتری *Micrococcus luteus* سوسپانسیون شده در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (پی اچ = ٦/۲) با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر نمونه به یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و کاهش جذب به‌مدت ٤ دقیقه ثبت گردید. هر ۰/۰۱ واحد کاهش جذب در دقیق معادل یک واحد فعال لیزوزیم در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان آلترناتیو (ACH50) به روش همولیتیک انجام شد (یانو، ۱۹۹۲). به‌این منظور از گلبول قرمز گوسفند به‌عنوان هدف و بافر ورونال- ژلاتین- EGTA- منیزیوم (بافر باربیتال با پی اچ ۷/٤-۷/۳ + ۱۰ میلی‌مول EGTA + ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$ + ۰/۱ درصد ژلاتین) استفاده شد. به‌این منظور رقت‌های مختلف (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۱۲ و ۰/۳۰٦ درصد) از نمونه سرم تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از این نمونه‌ها به ۱۲۵ میکرولیتر بافر و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز گوسفند اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر ورونال-ژلاتین- EDTA به همه نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ، جذب نوری محلول بالایی ثبت گردید. با استفاده از جذب رقت‌های مختلف، گراف برای همه نمونه‌ها رسم و رقتی که باعث ۵۰ درصد همولیز گردید محاسبه شد.

جهت اندازه‌گیری توتال ایمونوگلبولین از روش ترسیبی استفاده شد (سیویکی و اندرسون، ۱۹۹۳). برای اینکار از محلول پلی اتیلن گلیکول جهت ترسیب ایمنوگلبولین‌ها استفاده شد و سپس مقدار پروتئین نمونه قبل و بعد از ترسیب با استفاده از کیت تشخیص طبی پارس آزمون استفاده شد.

برای اندازه‌گیری توتال پروتئین و آلبومین از کیت‌های تجاری پراس آزمون استفاده شد. گلبولین با تفریق آلبومین و توتال پروتئین به‌دست می‌آید.

داده‌ها توسط آزمون تی (t-test) تجزیه و تحلیل شده و معنی‌داری اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ بررسی شد. تحلیل‌های آماری در نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ذکر شده‌اند.

نتایج

خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس در جدول ۱ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری در دما، اکسیژن محلول و pH آب بین استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس وجود نداشت ولی شوری و آمونیاک آب استخر خاکی به‌طور معنی‌داری بالاتر از حضچه‌های آب شیرین بود.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس در خلال پرورش ماهی.

	آب شیرین	آب شور	P
دما (سانتی‌گراد)	۱ ± ۱٤	۱ ± ۱۳	۰/۱۱۵
اکسیژن محلول (میلی‌گرم/ لیتر)	۰/۸٤ ± ۸/۵٦	۰/۵۵ ± ۸/۸۸	۰/۵۸۷
شوری (گرم/ لیتر)	۰/۱۲ ± ۲/۸۸	۱/۱۲ ± ۲۰/۷	۰/۰۰۰۱
pH	۰/۶۹ ± ۷/۵۲	۰/۵۵ ± ۸/٦۵	۰/۲۳۹
آمونیاک (میلی‌گرم/ لیتر)	۰/۰۰۰٤ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۱ ± ۰/۰۱	۰/۰۳۸

شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم ماهیان استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس در جدول ۲ ارائه شده‌اند. پروتئین کل، گلبولین، لیزوزیم، کمپلمان و توتال ایمنوگلبولین سرم در ماهیان استخر خاکی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان حوضچه‌های فایبرگلاس بود. اختلاف معنی‌داری در مقدار آلبومین سرم بین دو تیمار وجود نداشت.

جدول ۲: خصوصیات بیوشیمیایی سرم ماهیان پرورش یافته در استخر خاکی و حوضچه‌های فایبرگلاس

	آب شیرین	آب شور	P
پروتئین کل (گرم/ دسی‌لیتر)	۰/۷۲ ± ٤/۷۵	۰/۸۲ ± ۳/۳۵	۰/۰۰۵
آلبومین (گرم/ دسی‌لیتر)	۰/۳۲ ± ۱/۷٦	۰/۳۱ ± ۱/٦۷	۰/۲۵۱
گلبولین (گرم/ دسی‌لیتر)	۰/۳۹ ± ۳/۱۰	۰/۳۲ ± ۱/۷٤	۰/۰۰۰۱
توتال ایمنوگلبولین (گرم/ دسی‌لیتر)	۰/۳٤ ± ۲/۵۲	۰/٤٤ ± ۱/۸۹	۰/۰۰۰۱
لیزوزیم (واحد/ میلی‌لیتر)	۱۱/۱ ± ۹۷/۵	۹/۷۵ ± ۸۰/۳	۰/۰۳۳
کمپلمان (واحد/ میلی‌لیتر)	۱٦/۵ ± ۹۳/۲	۹/۱۸ ± ۵۱/۸	۰/۰۰۱

بحث

در این تحقیق مشاهده شد که ماهیانی که در استخر خاکی پرورش یافته بودند ایمنی پایین‌تری نسبت به ماهیان پرورش یافته در حضوچه فایرگلاس داشتند. کاهش فعایت لیزوزیم، کمپلمان و کاهش غلظت پروتئین، گلبولین و ایمنوگلبولین از نشانه‌های افت ایمنی هستند (تورت، ۲۰۱۱). لیزوزیم دارای خواص باکتری کشی است و کاهش فعالیت آن باعث کاهش قدرت بدن در کشتن باکتری‌ها می‌شود (ساوراب و ساهو، ۲۰۰۸). کمپلمان نیز باعث از بین رفتن دیواره سلولی باکتری‌ها شده و همچنین در تحریک فعالیت فاگوسیتوز گلبول‌های خونی مؤثر است (هالند و لمبریس، ۲۰۰۲). پروتئین‌های سرم نقش‌های متفاوتی دارند که یکی از آن‌ها نقش در ایمنی است (حسینی و ترخانی، ۲۰۱۳). انواع سایتوکین‌ها، ترنسفرین و سایر پروتئین‌ها در ایمنی نقش دارند و در این میان ایمنوگلبولین‌ها نقش مهمی در از بین بردن عوامل بیماری‌زا دارند (حسینی و همکاران، ۲۰۱٦).

شرایط محیطی در پرورش آبزیان، اهمیت زیادی در سلامت آن‌ها دارند. پرورش ماهی قزل‌آلا در آب شور در نقاط مختلف دنیا مورد مطالعه قرار گرفته است. مسائلی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که رشد و ایمنی قزل‌آلا در آب لب شور بیشتر از آب شیرین است. نفیسی بهابادی و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند که افزایش شوری آب باعث کاهش رشد و

افزایش استرس در ماهی قزل‌آلا می‌شود. مک‌کی و گیرده (۱۹۸۵) گزارش نمودند که شوری صفر و ۱۰ گرم بر لیتر تلفاتی در قزل‌آلا ایجاد نمی‌کند ولی در شوری ۳۲ گرم بر لیتر ۱۳ درصد تلفات رخ می‌دهد که نشان از افت ایمنی و سلامت ماهی دارد.

گزارش شده است که در ماهی قزل‌آلا، افزایش شوری باعث افزایش فعالیت لیزوزیم می‌شود (یادا و همکارن، ۲۰۰۸). دلیل این اختلاف می‌تواند تفاوت در شرایط آزمایش باشد به طوری‌که در مطالعه قبلی تنها عامل متغیر بین تیمارها، شوری آب بوده است ولی در این تحقیق دو روش پرورش با هم مقایسه شده‌اند و ممکن است عوامل دیگری هم به جز شوری بر نتایج اثرگذار بوده باشند. مثلا آمونیاک آب نیز در استخر آب شور بیشتر از حوضچه‌های فایبرگلاس بود. آمونیاک یک ماده سمی است که باعث تضعیف ایمنی در ماهی می‌شود. مثلا در گربه ماهی زرد، مسمومیت با آمونیاک باعث افت سلامت و کاهش فعالیت لیزوزیم شده است (لی و همکاران، ۲۰۱۶). همچنین، افزایش شوری در ماهی تیلاپیای موزامبیک نیز باعث افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان شده است (دومینگز و همکاران، ۲۰۰۵؛ جیانگ و همکاران، ۲۰۰۸). دلیل این تفاوت می‌تواند اختلاف بین گونه‌های ماهی باشد، زیرا تیلاپیا یک گونه یوری هالین است و شوری آب اثر زیادی بر آن ندارد و حتی گزارش شده است که کاهش شوری آب باعث تضعیف ایمنی آن می‌شود (چوی و همکاران، ۲۰۱۳).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پرورش ماهی قزل‌آلا در استخرهای آب شور خاکی باعث کاهش شاخص‌های ایمنی در قزل‌آلا می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها پروتئین کل، گلبولین، لیزوزیم، کمپلمان و توتال ایمنوگلبولین سرم هستند. این تغییرات ممکن است به‌دلیل بروز استرس‌های ناشی از شوری و آمونیاک آب باشد. همچنین سایر عوامل محیطی و مدیریتی نیز ممکن است در این خصوص مهم باشند. البته در ماهیان استخر خاکی بیماری خاصی مشاهده نشده است و به همین دلیل نمی‌توان با قاطعیت گفت که آیا این ماهیان نسبت به حضور عوامل بیماری‌زا نیز حساس هستند یا تغییرات خونی مقطعی است. پرورش ماهی قزل‌آلا در استخرهای خاکی آب شور امکان‌پذیر است ولی افزایش مدیریت (هوادهی، تعویض بیشتر آب و مدیریت غذادهی) جهت بهبود ایمنی ماهیان پرورشی ضروری است.

منابع

1. Bowden, T.J. 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. Fish. Shellfish. Immunol. 25: 373-383.
2. Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. Tech. Fish. Immunol. 1: 101-103.
3. Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish. Shellfish. Immunol. 9: 291-308.
4. Holland, M.C.H., and Lambris, J.D. 2002. The complement system in teleosts. Fish. Shellfish. Immunol. 12: 399-420.
5. Hoseini, S.M., Mirghaed, A.T., Mazandarani, M., and Zoheiri, F. 2016. Serum cortisol, glucose, thyroid hormones' and non-specific immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* to exogenous tryptophan and acute stress. Aquaculture. 462: 17-23.
6. Hoseini, S.M., and Tarkhani, R. 2013. Effect of short-term treatment with potassium permanganate on stress markers and blood biochemistry in goldfish *Carassius auratus*. Aquac. Res., 44: 869-875.
7. Magnadóttir, B., Jónsdóttir, H., Helgason, S., Björnsson, B., Solem,

S.T., and Pilström, L. 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). Fish. Shellfish. Immunol., 11: 75-89.
8. Makrinos, D.L., and Bowden, T.J. 2016. Natural environmental impacts on teleost immune function. Fish. Shellfish. Immunol. 53: 50-57.
9. Masaeli, S., Hoseinzade Sahafi, H., Alizade, M., and Negarestan, H. 2010. Comparison of blood factors and growth rate of rainbow trout in freshwater and brakishwater. Mar. Technol. Sci. Res., 5: 75-82.
10. McKay, L.R., and Gjerde, B. 1985. The effect of salinity on growth of rainbow trout. Aquaculture. 49: 325-331.
11. Nafisi Bahabadi, M. 2014. Changes in growth factors and hormonal responses of rainbow trout fingerlings during adaptation with different water salinities. Anim. Res., 27: 417-429.
12. Saurabh, S., and Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac. Res., 39: 223-239.
13. Schrøder, M.B., Villena, A.J., and Jørgensen, T.Ø. 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Dev. Comp. Immunol. 22: 507-517.
14. Siwicki, A.K., and Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and manocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum.
15. Soltani, M. 2014. Fish and shellfish immunology. Tehran university publication. 246p.
16. Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. Dev. Comp. Immunol., 35: 1366-1375.
17. Watts, M., Munday, B.L., and Burke, C.M. 2001. Immune responses of teleost fish. Aust. Vet. J. 79: 570-574.
18. Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish–a review of current knowledge. Fish. Shellfish. Immunol. 23: 1127-1151.
19. Yada, T., Hyodo, S., and Schreck, C.B. 2008. Effects of seawater acclimation on mRNA levels of corticosteroid receptor genes in osmoregulatory and immune systems in trout. Gen. Comp. Endocrinol. 156: 622-627.
20. Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. Tech. Fish. Immunol. 2: 131-141.