بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۸
۱۱-۲۰
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.14517.1424

اثر اسید فرمیک در جیره بر ایمنی موکوسی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم خون در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

الهام بهرامی شیخ سرمست[۱]، سعید مشکینی[۲] و *رقیه صفری[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه ارومیه، [۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه ارومیه،
[۳]استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف اسید فرمیک در جیره غذایی بر شاخص‌های ایمنی موکوس کپور معمولی صورت پذیرفت. بدین‌منظور تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی ۵±۲۱ گرم به‌مدت ۸ هفته، در چهار تیمار و سه تکرار با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسید فرمیک تغذیه شدند. در پایان دوره از موکوس و سرم خون نمونه‌برداری گردید. میزان فعالیت پروتئاز موکوس و ایمونوگلوبین موکوس و سرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). میزان لیزوزیم سرم و موکوس نیز در تیمار تغذیه شده با ۲ درصد اسید فرمیک افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که بهترین عملکرد لیزوزیم و پروتئاز به‌عنوان شاخص‌های ایمنی در استفاده از جیره حاوی ۲ درصد اسید فرمیک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید فرمیک، ایمنی، خون، کپور معمولی، موکوس

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری جهانی طی چند دهه اخیر رشد قابل‌توجهی داشته است و به یک بخش تولیدی اقتصادی مهم تبدیل شده است. در کنار این رشد عواملی مانند تراکم بالا و به‌دنبال آن کاهش کیفیت آب و افزایش استرس، کاهش عملکرد سیستم ایمنی و افزایش خطر ابتلا به بیماری در آبزیان و به دنبال آن کاهش بازده تولید و ضرر و زیان اقتصادی را به‌همراه دارد. استفاده پیشگیرانه و درمانی آنتی‌بیوتیک‌ها طی چند سال گذشته سبب بروز باکتری‌های مقاوم، تجمع زیستی درگوشت آبزیان و پایین آوردن کیفیت گوشت و مشکلات زیست‌محیطی شده است (کابلو، ۲۰۰۶).

* مسئول مکاتبه: roghi_safari@yahoo.com

این مشکلات باعث شده است تا پژوهشگران به بررسی روش‌های جایگزین و استفاده از محرک‌های ایمنی سازگار با محیط‌زیست و ارزان‌قیمت بپردازند (پولنز و گاتلین، ۲۰۱٤). محرک‌های ایمنی شامل ترکیبات مصنوعی یا طبیعی هستند که با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی و ... سبب بهبود عملکرد سیستم ایمنی و به تبع آن افزایش رشد در ماهی می‌شوند (پولنز و گاتلین، ۲۰۱٤). ز جمله این ترکیبات می‌توان به مواد گیاهی، اسیدهای آلی و نمک‌های آن، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها اشاره کرد (لاکاستات، ۲۰۰۸؛ داسیلوا و همکاران، ۲۰۱۳).

اسیدهای آلی، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (C1-C7)، اسیدهای چرب فرار و اسیدهای کربوکسیلیک ضعیفی هستند که در ساختارشان دارای یک یا بیش از چند گروه کربوکسیل می‌باشند (نگ و همکاران، ۲۰۰۹) از بین این ترکیبات آن‌هایی که بین ۱ تا ۷ کربن دارند، دارای اثرات ضد میکروبی هستند. امروزه توجه ویژه‌ای به کاربرد تجاری اسیدهای آلی در جیره ماهیان و سایر جانداران در جهت کنترل بیماری و افزایش کارایی رشد صورت می‌گیرد اسیدهای آلی به‌عنوان ترکیبات مقرون به‌صرفه و با خاصیت بهبود عملکرد بدن و خواص ضد میکروبی، گزینه‌ای مطمئن برای صنعت خوراک آبزیان می‌باشند (رفعتی، ۲۰۰۹). بهبود عملکرد سیستم ایمنی و رشد در آبزیان با به‌کارگیری اسیدهای آلی در جیره در گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) (اون و همکاران، ۲۰۰٦)، هیبرید تیلاپیا (*Oreochromis* sp.) (ژو و همکاران، ۲۰۰۹)، سیم دریایی (*Pagrus major*) (حسین و همکاران، ۲۰۰۷) و کپور روهو (*Labeo rohita*) (براهو و همکاران، ۲۰۰۷)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (صفری و همکاران، ۲۰۱۷)، زبرا (*Danio rerio*) (صفری و همکاران، ۲۰۱٦) و ماهی سفید (*Rutilus frissi kutum*) (حسینی‌فر و همکاران، ۲۰۱٦) گزارش شده است. این ترکیبات با تحریک ترشح آنزیم معده، قابلیت هضم و جذب مواد غذایی و خواص ضدمیکروبی، سبب بهبود نرخ تبدیل غذا، افزایش وزن و ایمنی آبزی می‌شود که موجب عرضه محصول در زمان کوتاه‌تر به بازار شده و در نهایت کاهش هزینه‌ها (به‌ویژه در بخش هزینه غذا) را به دنبال خواهد داشت. اگرچه مطالعاتی در زمینه استفاده از برخی اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها در گونه‌های مختلف آب شیرین و شور گزارش شده است اما بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است که مطالعه‌ای در زمینه استفاده از اسید فرمیک در بهبود وضعیت ایمنی در ماهی کپور گزارش نشده است و گزارش مطالعات استفاده از اسید فرمیک در آبزیان و ماهیان محدود به مطالعه کاربرد اثرات سطوح مختلف مکمل مخلوط اسیدهای آلی محتوی اسید فرمیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید ارتوفسفریک، اسید لاکتیک، اسید تارتاریک بر کارایی رشد و ترکیب لاشه و شاخص‌های خونی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (سلیمانی ایریایی و همکاران، ۱۳۹۱) می‌باشد. از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات به‌کارگیری اسید فرمیک در جیره بر ایمنی موکوسی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم خون در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام نشده است مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این محرک بر شاخص‌های مذکور در ماهی کپور معمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تیماربندی و نمونه‌برداری: این مطالعه در بهار ۱۳۹٦ به‌مدت ۸ هفته در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی‌برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

گرگان انجام شد. ۳٦۰ قطعه ماهی کپور معمولی (با میانگین وزنی ۵±۲۲ گرم) از از کارگاه تکثیر و پرورش بخش خصوصی خریداری شد. پس از طی حدود ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به تعداد ۳۰ قطعه و به‌صورت تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در ۱۲ تانک توزیع شدند. قبل از ذخیره‌سازی، مخزن‌ها به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و سپس با آب شست‌وشو داده شدند. جهت حفظ کیفیت آب هفته‌ای دوبار، دو سوم حجم آب مخازن پرورشی تعویض شده و مدفوع ماهی و باقی‌مانده غذا از طریق سیفون کردن از محیط خارج گردید. اسید فرمیک مورد استفاده در این آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

تیمارهای غذایی شامل جیره‌های حاوی ۰ (گروه شاهد؛ جیره بدون اسید فرمیک)، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد (صفری و همکاران، ۲۰۱۷) بود و ماهیان مورد آزمایش به‌میزان ۵-۳٪ وزن بدن روزانه ۲ بار تغذیه شدند. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رنج pH ۸-۷ و میانگین اکسیژن ۹ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری موکوس: جهت جمع‌آوری موکوس در انتهای دوره غذادهی به‌مدت ٢٤ ساعت قطع گردید. موکوس با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمک (مرک آلمان) ۵۰ میلی‌مولار از نمونه‌ها در طی زمان ۳ دقیقه در پلاستیک جمع‌آوری و توسط دستگاه سانتریفیوژ (5810R Eppendorf, Engelsdorf, Germany) با دور ۱۵۰۰×g دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتریفیوژ شدند، سپس مایع سطحی جمع‌آوری و به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (سابرامانیان و همکاران، ۲۰۰۷).

سنجش فعالیت پروتئاز موکوس: اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز طبق روش (راس و همکاران، ۲۰۰۰) انجام شد. ۱۰۰ میلی‌مول از نمونه با ۱۰۰ میلی‌مول آمونیوم بیکربنات (pH ۷/۸) و بافر حاوی ۰/۷ درصد آزوکازئین برای ۱۹ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. واکنش با افزودن تری‌کلرواستیک اسید (٤/٦ درصد غلظت نهایی) و خنک کردن در یخ متوقف شد. مخلوط واکنش با دور ۱۳۰۰۰ rpm برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع جدا شده درون چاهک‌های میکروپلیت قرار داده شد که خود حاوی میزان برابر آمونیاک ۰/۵ مولار (سیگما) بود. تریپسین (سیگما) و بافر آزمایش به‌ترتیب به جای نمونه کنترل مثبت و منفی استفاده شد. فعالیت پروتئاز به‌دلیل افزایش شدت عبور نور در ٥٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم: میزان لیزوزیم با اصلاحاتی جزئی طبق روش کدورت‌سنجی الیس (۱۹۹۰) محاسبه شد. ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه موکوس در سه چاهک پلیت‌های ۹٦ چاهکی قرار داده شد و ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (شرکت سیگما) با تراکم ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر در ۰/۵ مولار بافر فسفات نمکی با pH ٦/۲ اضافه شد. به‌عنوان شاهد، بافر فسفات نمکی به جای سرم قرار داده شد. در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد میزان کاهش شدت عبور نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر بعد از ۱ و ۵ دقیقه ثبت شد. یک واحد از فعالیت لیزوزیم در اثر کاهش جذب ۰/۰۰۱ در هر دقیقه تعریف می‌شود.

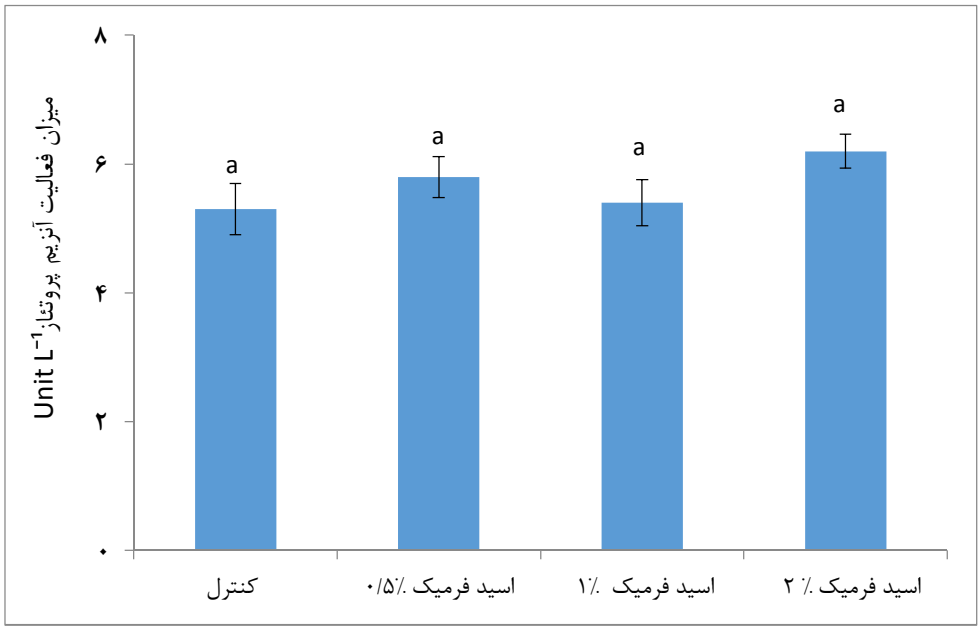
اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل: میزان ایمونوگلوبولین کل طبق روش (سیویکی و اندرسون، ۱۹۹۳) اندازه‌گیری شد که مختصراً شرح آن توضیح داده می‌شود. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۰/۱ میلی‌لیتر از

محلول پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲٪ (سیگما) مخلوط شد و به‌مدت ۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد تا ملکول‌های ایمونوگلوبولین ته‌نشین شوند. سپس با دستگاه سانتریفیوژ (اپندروف آلمان، ۵٤۱۵) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و دور ۵۰۰۰ g پروتئین ته‌نشین شده جدا شد. میزان پروتئین کل در نمونه پیش از افزودن PEG محاسبه شد و مقدار ایمونوگلوبولین کل بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

آنالیز آماری: ابتدا نرمال بودن داده‌های حاصل با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شده و در صورت نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه بین تیمارهای آزمایشی از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح احتمال (P<۰/۰۵) استفاده می‌شود. آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) انجام می‌شود. نتایج به‌صورت (انحراف معیار ± میانگین) بیان می‌شود.

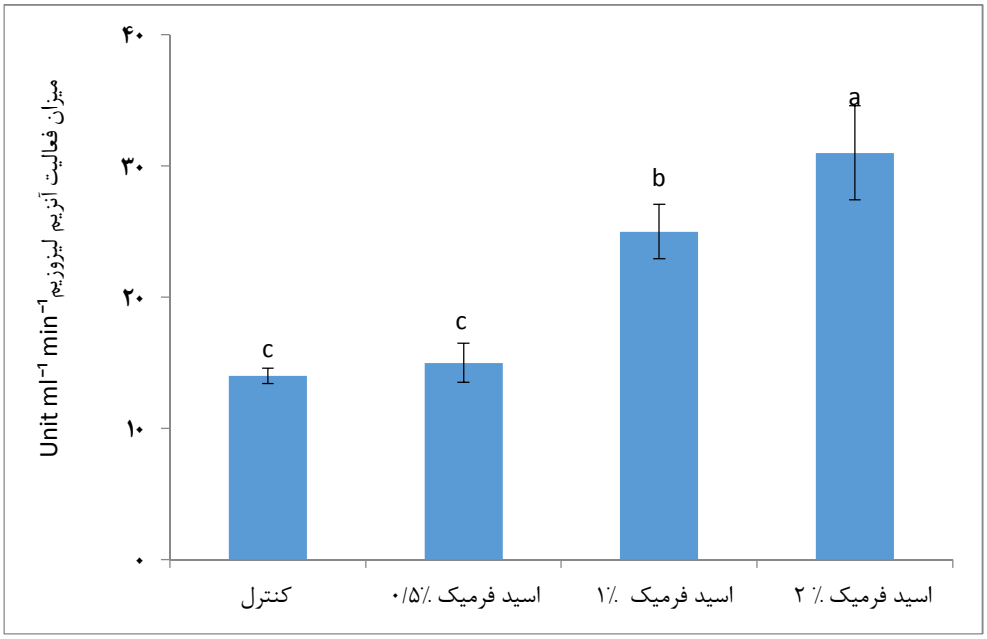
نتایج

فعالیت آنزیم پروتئاز: میزان فعالیت آنزیم پروتئاز نمونه‌های موکوس اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مختلف تغذیه‌شده با اسید فرمیک نشان نداد، هر چند میزان آن در تیمار ۲٪ بیش‌تر از سایر تیمارها بود (P>۰/۰۵) (شکل ۱).



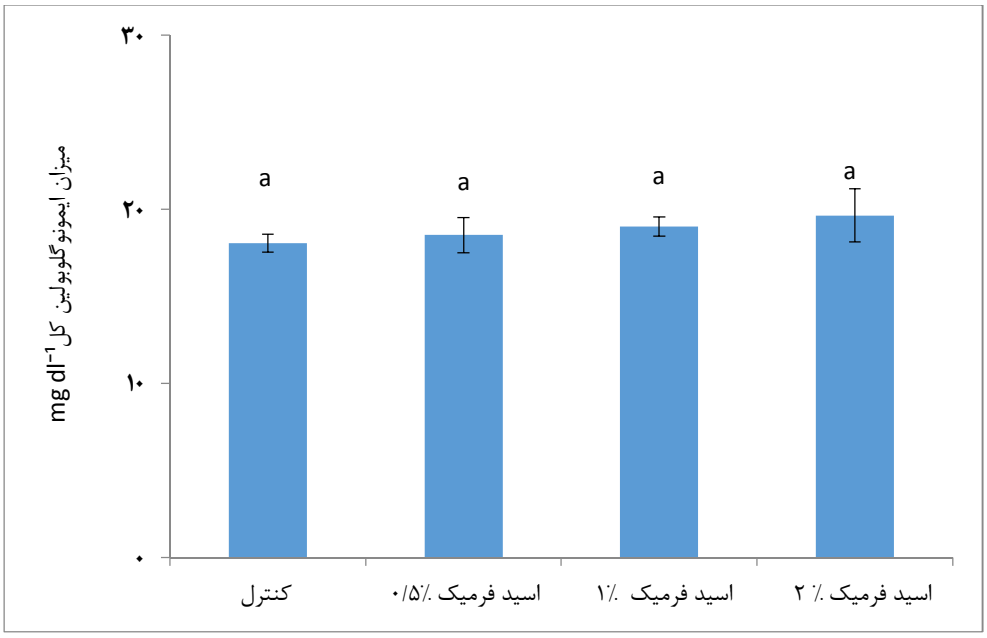
شکل ۱- فعالیت آنزیم پروتئاز در نمونه موکوس کپورماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف اسید فرمیک طی هشت هفته (انحراف معیار ± میانگین).

فعالیت آنزیم لیزوزیم: فعالیت آنزیم لیزوزیم در نمونه‌های موکوس ماهیان تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف اسید فرمیک بررسی شد. نتایج افزایش وابسته به دوز را در میزان لیزوزیم نشان داد به‌طوری‌که بیش‌ترین افزایش مربوط به دوز ۲٪ بود. هر چند که بین تیمار ۰/۵ و ۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) ولی بین تیمارهای ۲ و ۱٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۲).



شکل ۲- میزان فعالیت لیزوزیم در نمونه موکوس کپورماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف اسید فرمیک طی هشت هفته (انحراف معیار ± میانگین).

ایمونوگلوبولین کل: میزان ایمونوگلوبولین کل با افزایش میزان اسید فرمیک در جیره افزایش وابسته به دوز را نشان داد ولی این افزایش و اختلاف در تیمارهای مختلف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳- میزان ایمونوگلوبولین کل در نمونه موکوس کپورماهیان تغذیه‌شده با سطوح مختلف اسید فرمیک طی هشت هفته (انحراف معیار ± میانگین).

ارزیابی شاخص‌های ایمنی سرم: نتایج به‌دست آمده از بررسی استفاده از غلظت‌های مختلف اسید فرمیک در جیره غذایی ماهی کپور در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که در جدول نشان داده شده است بیش‌ترین میزان لیزوزیم در تیمار ۲ درصد و کم‌ترین آن در گروه شاهد مشاهده گردید. بین تیمار حاوی ۲ و ۱٪ اسید فرمیک اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P<۰/۰۵$). میزان ایمنوگلوبولین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱- شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی (لیزوزیم و ایمنوگلوبولین) در ماهی کپور تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف اسید فرمیک.

فاکتورها/ تیمارها	۰٪ اسید فرمیک	۰/۵٪ اسید فرمیک	۱٪ اسید فرمیک	۲٪ اسیدفرمیک
لیزوزیم	۲۰/٦٦±۰/۵[a]	۲۳±۲/۵[a]	۲۷±۲/۵[b]	۲۷/٦٦±۱/۵۲[b]
ایمونوگلوبین	۳٤/۸±۰/۹۸[a]	۳٤/۵±۱/٤۷[a]	۳۳/۱±۰/۵[a]	۳۲/٦±۰/٤۵[a]

* حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

** داده‌ها به‌صورت (SD ± میانگین) بیان شده است.

بحث

در صنعت آبزی‌پروری به جهت افزایش تولید و تراکم از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای مختلفی برای افزایش رشد و بازدهی و مقاومت در برابر بیماری استفاده می‌شود. این در حالی است که به دلایل زیست‌محیطی و انسانی طی دهه‌های اخیر برای رسیدن به این تولید و جلوگیری از اثرات زیان‌بار، استفاده از مواد ذکرشده با قوانین ممنوعیت و محدودیت روبرو شده و استفاده از مواد طبیعی جهت تقویت سیستم ایمنی متداول شد (لیو و همکاران، ۲۰۱٤) و مطالعات به‌سمت اثرات تغذیه‌ای محرک‌های طبیعی ایمنی و مهارکننده عوامل بیماری‌زا به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و عصاره‌های گیاهی سوق پیدا کرد (رمانو و همکاران، ۲۰۱۵؛ صفری و همکاران، ۲۰۱۷). ایمنی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و حفظ هموستازی بدن است. یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهی‌ها ایمنی موکوسی می‌باشد. اجزاء موجود در موکوس شامل لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان (عامل مکمل)، لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش‌دهنده C و دیگر پروتئین‌های آنتی‌باکتریال (سابرامانیان و همکاران، ۲۰۰۷) می‌باشد، که هر کدام به‌نحوی در جهت افزایش فعالیت سیستم ایمنی ماهی ایفای نقش می‌کنند.

آنزیم لیزوزیم به‌صورت گسترده‌ای در ماکروفاژها، میکروب‌ها، گیاهان، بی‌مهرگان و مهره‌داران وجود دارد و نیز در ترشحات بسیاری از حیوانات از جمله موکوس مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم لیزوزیم در نمونه‌های موکوس ماهیان تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف اسید فرمیک افزایش وابسته به دوز را در میزان لیزوزیم نشان داد به‌طوری‌که بیش‌ترین افزایش مربوط به دوز ۲٪ بود. هر چند که بین تیمار ۰/۵ و ۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) ولی با تیمارهای ۲ و ۱٪ اختلاف

معنی‌داری نشان دادند. صفری و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی کپور معمولی و حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی گورخری با افزودن پروپیونات به جیره شاهد افزایش میزان لیزوزیم در سرم و موکوس بودند ولی این اختلاف بین تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروپیونات معنی‌دار نبود. از طرف دیگر حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱٦) در ماهی‌های سفید دریای خزر تغذیه‌شده با ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد پروپیونات سدیم نسبت به تیمار شاهد افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم را شاهد بودند ولی در تیمار ۱ و ۲ درصد این اختلاف با تیمار فاقد پروپیونات سدیم معنی‌دار نبود. اسیدهای چرب کوتاه زنجیره علاوه بر اثرات مفید بر فیزیولوژی دستگاه گوارش با اتصال به گیرنده GPR43 سبب تحریک سلول‌های دخیل در ایمنی غیراختصاصی و التهابی مانند نوتروفیل و ماکروفاژها و بهبود وضعیت ایمنی می‌شوند (ماکی و ماسلوسکی، ۲۰۱۰).

ایمونوگلوبین‌ها جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی بوده و به‌صورت کاملاً تنظیم شده در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌شوند و محافظت فوری، بلافاصله و گسترده‌ای را در برابر عوامل بیماری زا ایجاد می‌کنند. این مورد آن‌ها را به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی تبدیل کرده است. تغییر در سطوح ایمونوگلوبین سرم خون و موکوس در مطالعات بسیاری به تبع استفاده از محرک‌های ایمنی گزارش شده است (نایاک و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر میزان ایمونوگلوبولین کل با افزایش میزان اسید فرمیک در جیره افزایش وابسته به دوز را نشان داد ولی این افزایش و اختلاف در تیمارهای مختلف معنی‌دار نبود. مطالعات انجام شده بر روی اثر افزودن پروپیونات سدیم به جیره بر روی گونه‌های مختلف ماهی نتایج متفاوتی را در بر داشت. حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱۷) با کار بر روی ماهی گورخری مشاهده کردند که تیمار شاهد و تیمار ۱ درصد فاقد اختلاف بودند، همچنین اختلافی بین تیمار ۰/۵ و ۲ درصد مشاهده نشد، ولی بین تیمار ۰ و ۱ با تیمار ۰/۵ و ۲ اختلاف وجود داشت و در گروه دوم افزایش ایمونوگلوبولین کل مشاهده شد. از طرفی صفری و همکاران (۲۰۱۷) با افزودن پروپیونات سدیم به غذای کپور معمولی شاهد افزایش ایمونوگلوبین کل در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد نسبت به تیمار شاهد بودند ولی در سطح ۲ درصد اگرچه شاهد افزایش ایمونوگلوبین کل مشاهده شد ولی این اختلاف با تیمار شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بود. در مطالعه حسینی‌فر (۲۰۱٦) بر روی افزودن پروپیونات سدیم به جیره ماهی سفید دریای خزر، جیره حاوی کم‌ترین میزان پروپیونات سدیم در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد ولی در جیره‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد تفاوتی با تیمار شاهد مشاهده نشد. یک بخش از سیستم دفاع غیراختصاصی در ماهی و سایر مهره‌داران سیستم لنفوئیدی در ارتباط با دستگاه گوارش (GALT) است که نقش عمده‌ای در ارتباط با بروز و تنظیم پاسخ‌های ایمنی در پاسخ به مواد غذایی دارد (نایاک و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش میزان ایمونوگلوبین‌ها را می‌توان به تأثیر بر سیستم (GALT) نسبت داد که بهبود وضعیت سیستم دفاعی اولیه را به دنبال دارد.

پروتئازها یکی دیگر از عوامل موجود در موکوس ماهی‌ها هستند. پروتئازهایی مانند تریپسین، کاتپسین بی ال (سیستین پروتئاز)، کاتپسین دی (اسپارت یک پروتئاز) و متالوپروتئازها در موکوس پوست ماهیان شناسایی شده است. پروتئاز موکوس پوست در مقاومت طبیعی در برابر عفونت‌های پوست ماهی

نقش دارد. ترشح پروتئازها در موکوس پوست مستقیماً بر پاتوژن‌ها عمل کرده (باکتری‌ها را از طریق شکستن پروتئین‌ها از بین می‌برند) یا ممکن است به‌طور غیرمستقیم از طریق تغییر غلظت موکوس علیه پاتوژن‌ها عمل نماید (استبان، ۲۰۱۲). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز نمونه‌های موکوس اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مختلف تغذیه‌شده با اسید فرمیک نشان نداد (P>۰/۰۵). نتایج مطالعه حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر پروپیونات سدیم جیره ماهی گورخری نیز به همین نتیجه دست یافتند و تیمارهای مختلف آزمایش آن‌ها نیز اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم پروتئاز موکوسی نشان نداد. حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱٦) تغییرات میزان آنزیم پروتئاز موکوس ماهی سفید دریای خزر را بررسی کردند و مشاهده کردند که میزان پروتئاز جیره حاوی ۰/۲۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد، به‌شدت افزایش داشته؛ این میزان در تیمار ۰/۵ درصد نیز افزایش معنی‌داری را نشان داده ولی میزان آن کم‌تر از تیمار ۰/۲۵ درصد بود. تیمار ۱ و ۲ درصد ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد و تیمار ۰/۵ درصد بودند که این می‌تواند نشانگر تأثیر متفاوت پروپیونات سدیم در گونه‌های متفاوت ماهی باشد. اسیدهای آلی و نمک‌های آن در تغذیه حیوانات به‌خصوص در دام مورداستفاده قرار گرفته است. در این بین مطالعاتی در رابطه با ماهی نشان داده است در زمان استفاده از چنین اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها (عمدتاً سدیم، پتاسیم و کلسیم) در جیره آبزیان این مواد افزودنی طبیعی دارای توانایی تحریک عملکرد رشد، بهبود وضعیت سلامتی و افزایش مقاومت در برابر بیماری می‌باشند (انارسی، ۲۰۱۱). این ترکیبات با ورود به داخل سلول (به شکل غیریونیزه) از طریق غشای سلولی و با کاهش pH درون‌سلولی موجب اختلال در سیستم سنتز پروتئینی، مواد ژنتیکی و آنزیم‌های متابولیکی در باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند. علاوه بر این باکتری‌ها برای حفظ اسیدیته داخل‌سلولی برای خروج پروتون‌ها انرژی بیش‌تری (ATP) صرف می‌کنند و توانایی سلول جهت حفظ اسیدیته مطلوب را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و در نهایت موجب مرگ باکتری می‌شود (داسیلوا و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین با حذف باکتری‌های بیماری‌زا ارتقاء عملکرد ماهی را به همراه خواهد داشت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد جیره‌های حاوی اسیدفرمیک (به‌ویژه در سطح ۲ درصد) اثر مثبت بر سطح بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و لیزوزیم سرم و پروتئاز و ایمونوگلوبین موکوس به‌عنوان شاخص‌های ایمنی داشته است که نشان می‌دهد می‌توان از این اسید جهت بهبود وضعیت سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی استفاده نمود که به افزایش بهره‌وری اقتصادی در پرورش تجاری این ماهیان با افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش‌های محیطی و غیرمحیطی کمک شایانی خواهد نمود. با این‌وجود تعیین دقیق مکانیسم اثرگذاری اسید فرمیک بر وضعیت ایمنی ماهی مستلزم انجام مطالعات بیش‌تری در این راستا می‌باشد.

منابع

1. Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D., and Mukherjee, S.C. 2007. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. Aquaculture Research, 38: 109-120.
2. Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology, 8: 1137-1144.
3. da Silva, B.C., Vieira, F.d.N., Mouri no, J.L.P., Bolivar, N., and Seiffert, W.Q. 2016. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 47: 612-623.
4. Hoseinifar, S.H., Safari, R., and Dadar, M. 2017. Dietary sodium propionate affects mucosal immune parameters, growth and appetite related genes expression: Insights from zebrafish model. General and Comparative Endocrinology, 243: 78-83.
5. Hoseinifar, S.H., Zoheiri, F., and Caipang, C.M. 2016. Dietary sodium propionate improved performance, mucosal and humoral immune responses in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish and shellfish immunology, 55: 523-528.
6. Hossain, M.A., Pandey, A., and Satoh, S. 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream Pagrus major. Fisheries science, 73: 6. 1309-1317.
7. Ingram, G. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review. J. Fish Biol. 16: 1. 23-60.
8. Lückstädt, C. 2008. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. Feed Mix 14: 3. 11-12.
9. Nayak, S.K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research. 41: 1553-1573.
10. Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K., and Siti Zahrah, A. 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, Oreochromis sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research, 40: 13. 1490-1500.
11. Owen, M., Waines, P., Bradley, G., and Davies, S. 2006.The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). In Proceedings of the XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding, 28: 149.
12. Pohlenz, C., and Gatlin, D.M. 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. Aquaculture, 431: 111-117.
13. Rafati, A., Davies, M.C., Shard, A.G., Hutton, S., Mishra, G., and Alexander, M.R., 2009. Quantitative XPS depth profiling of codeine loaded poly (l-lactic acid) films using a coronene ion sputter source. J. Control. Release. 138: 1. 40-44.
14. Romano, N., Koh, C.B., and Ng, W.K. 2015. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquaculture, 435: 228-236.
15. Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., and Jojnson, S.C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. Disease of Aquatic Organisems, 41: 43-51.
16. Safari, R., Hoseinifar, S.H., and Kavandi, M. 2016. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. Fish physiology and biochemistry. 42: 6. 1733-1739.
17. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nejadmoghadam, S., and Khalili, M. 2017. Non specific immune parameters, immune, antioxidant and growth related genes expression of common carp (*Cyprinus carpio*.) fed sodium propionate. Aquaculture Research. 10: 1-10

18. Siwicki, A., and Anderson, D. 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. Pp: 105-111.
19. Skrivanova, E., Marounek, M., Benda, V., and Brezina, P. 2006. Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella sp. and Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin. Veterinarni Medicina - Praha. 51: 3. 81-87.
20. Subramanian, S., MacKinnon, S.L., and Ross, N.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.
21. Zhou, Z., Liu, Y., He, S., Shi, P., Gao, X., Yao, B., and Ringø, E. 2009. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂). Aquaculture, 291: 89-94.
22. Zhu, L., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. 2013. Advances in research of fish immunerelevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. Developmental and Comparative Immunology. 39: 1-2. 39-62.