تاثیر نوکلئوتید موجود جیره بر فعالیت کمپلمان‌های C_3، C_4 و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae*

احمد طهماسبی‌کهیانی[1*]، سعید کیوان‌شکوه[2]، امین نعمت‌اللهی[3]، امیر پرویز سلاطی[4]، علی پارسه[5]
نعمتا... محمودی[6]، حسین پاشا زانوسی[7]

۱ـ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر،
پست الکترونیکی: ahmadtahmasebi@ymail.com
۲ـ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر،
پست الکترونیکی keyvan56@yahoo.com
۳ـ بخش آبزیان، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، استان چهارمحال و بختیاری، شهرکرد،
پست الکترونیکی: amin_nn@hotmail.com
۴ـ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر،
پست الکترونیکی: salatia@gmail.com
۵ـ دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، استان مازندران، تنکابن،
پست الکترونیکی: aliparseh@gmail.com
۶ـ دانشجوی دوره دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور،
پست الکترونیکی: mahmoudi.nemat@gmail.com
۷ـ گروه فیزیک دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر ، استان خوزستان، خرمشهر،
پست الکترونیکی: pashazanoosi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۱۶ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۹

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۰، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

در این پژوهش تاثیر نوکلئوتید جیره بر میزان کمپلمان‌های C_3، C_4 و مقاومت در برابر باکتری *Streptococcus iniae* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. نوکلئوتید جیره در ۴ سطح ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۱۵ و ۰/۲۰ درصد به جیره غذایی اضافه گردید و جیره فاقد نوکلئوتید برای تغذیه گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. هر جیره به‌صورت تصادفی برای ماهیان با وزن اولیه تقریبی ۲۳ گرم در سه تکرار اختصاص داده شد. بعد از ۸ هفته تغذیه، سطح سرمی کمپلمان‌های C_3، C_4 در ماهیان تغذیه شده با نوکلئوتید به‌طور معنی‌داری کمتراز گروه کنترل بود ($P<0/05$). رویارویی با باکتری در ماهیان با تزریق درون صفاقی باکتری به میزان 9×10^6 CFU/ml انجام شد. تلفات روزانه به‌مدت ۳ هفته پس از آزمایش ثبت گردید. نتایج آزمایش رویارویی با باکتری نشان داد که میزان بازماندگی در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نوکلئوتید افزایش یافت که دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد است ($P<0/05$). نتایج این آزمایش نشان‌دهنده‌ی این بود که افزودن نوکلئوتید جیره به‌میزان ۰/۱۵ و ۰/۲۰ درصد دارای اثرات مثبت بر میزان کمپلمان‌های C_3، C_4 و مقاومت نسبت به باکتری *S. iniae* در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، نوکلئوتید، باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

۱. مقدمه

توسعه‌ی آبزی‌پروری در دو دهه‌ی گذشته روندی صعودی داشته و نقش بسیار مهمی در تأمین غذای انسان‌ها، ایجاد اشتغال و توسعه‌ی روستایی ایفا نموده است. اگرچه طی چند سال اخیر در کشور ما نیز به مقوله پرورش ماهی توجه ویژه‌ای شده و طرح‌های گسترده‌ای در این زمینه اجرا گردیده است، اما میان افزایش سطح تولید و احداث کارگاه‌های جدید هماهنگی وجود ندارد. بدیهی است که این مهم جز با اجرای سامانه‌های نوین پرورشی و افزایش تراکم ماهی در مزارع میسر نمی‌شود که لازمه‌ی آن رعایت بسیار دقیق اصول بهداشتی و پیشگیری از بیماری‌ها و اصلاح روش‌های مدیریتی است. از جمله بیماری‌های مهم که در دهه‌ی اخیر در نتیجه‌ی رشد آبزی‌پروری افزایش یافته و باعث ضرر اقتصادی قابل توجهی در صنعت پرورش ماهی شده است، استرپتوکوکوزیس است که نوعی بیماری عفونی سپتی‌سمیک در ماهیان آب شیرین و شور محسوب می‌شود که توسط گونه‌های باکتریایی کوکسی گرم مثبت شامل *Lactococcus* sp. ،*Streptococcus* sp. ،*Vagococcus* sp. و *Entrococcus* sp. ایجاد می‌شود (Agnew, 2007). خسارت سنگینی که پرورش‌دهندگان در برخورد با این بیماری متحمل آن می‌شوند موجب گشته تحقیقات متعددی در زمینه‌ی استفاده از محرک‌های ایمنی که سبب افزایش مقاومت نسبت به این باکتری بیماری‌زا و تقویت سامانه‌ی ایمنی در ماهی می‌شود، اجرا گردد. نوکلئوتیدها از جمله این مکمل‌ها هستند که تاثیرات فراوان آنها در موجودات خشکی‌زی و آبزی ثابت گردیده است (Li and Gatlin, 2006).

محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی هستند که با افزایش عملکرد سلول‌های فاگوسیتیک و فعالیت ضد باکتریایی و نیز با تولید آنتی‌بادی موجب تحریک پاسخ‌های ایمنی می‌گردند (Sakai, 1999). تحقیقات فراوانی در سال‌های اخیر در توسعه‌ی استفاده از مکمل‌های غذایی که در بالابردن ایمنی در آبزیان نقش دارند، صورت گرفته است. از جمله این مکمل‌ها نوکلئوتیدها هستند که تاثیرات فراوان آنها در موجودات خشکی و آبزی ثابت گردیده است (Danilova, 2006; Magnadottir, 2006). به‌طور کلی بیشتر مطالعات انجام شده روی اثر نوکلئوتیدها در ماهیان و سایر جانداران، بر سامانه‌ی ایمنی و مقاومت به بیماری‌ها متمرکز شده است. کمپلمان‌ها از مهمترین عوامل دفاعی هستند که از حدود ۳۵ پروتئین محلول در پلاسما تشکیل شده‌اند که نقش کلیدی در ایمنی ذاتی و اکتسابی دارند (Boshra et al., 2006). بسیاری از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت کمپلمان در سرم ماهیان می‌شوند (Montero et al., 1999).

نوکلئوتیدها از جمله ترکیبات داخل سلولی با وزن ملکولی پایین، متشکل از یک بنیان پورین یا پیریمیدین و یک قند ریبوز یا ۲ـ دی اکسی ریبوز و یک یا تعدادی گروه فسفات هستند که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نقش دارند. این فرآیندها شامل ذخیره، انتقال و بیان اطلاعات ژنتیکی، نقش میانجیگری در متابولیسم انرژی، به‌عنوان ترکیبات کوآنزیم و محرک‌های آلوستریک هستند (Cosgrove, 1998).

با توجه به تحقیقات انجام شده در موجودات مختلف، نوکلئوتید جیره دارای نقش‌های متابولیک متعددی از جمله بهبود شاخص‌های ایمنی بدن (ذاتی و اکتسابی)، افزایش مقاومت به بیماری و بیان ژن پارامترهای ایمنی است (Boza, 1998، Low et al., 2003). تحقیقات روی ماهی نشان داده است که نوکلئوتید جیره می‌تواند بر ترکیبات هورمونی و سلولی سامانه‌ی ایمنی ذاتی اثرگذار باشند. Sakai و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که نوکلئوتیدهای خارجی می‌توانند فعالیت کمپلمان سرم (مسیرآلترناتیو) و فعالیت لیزوزیم، همچنین فعالیت بیگانه‌خواری و تولید آنیون سوپراکسید از سلول‌های بیگانه‌خوار رأس کلیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را افزایش دهند.

لذا با توجه به اثرات بسیار متنوع نوکلئوتید جیره بر سامانه‌ی فیزیولوژیک بدن موجودات، مطالعه‌ی حاضر به‌منظور بررسی تاثیر نوکلئوتید جیره بر میزان بازماندگی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از رویارویی با باکتری *S. iniae* طراحی و اجرا گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲ـ۱. آماده‌سازی ماهیان مورد آزمایش

این تحقیق در مهر ماه ۱۳۸۸ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی قزل برم واقع در استان چهارمحال و بختیاری در

شهرستان لردگان انجام شد. آب این مرکز از چشمه برم در فاصله ۵۰۰ متری مرکز تامین می‌گردد که دبی ورودی آن ۵۰۰ لیتر بر ثانیه است. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب همچون دمای آب، اکسیژن محلول و pH به‌صورت هفتگی انجام شد. در طول دوره‌ی پرورش میانگین دمای آب ۰/۲۱±۱۳/۳۲ درجه سانتی‌گراد، pH آب برابر ۰/۰۹±۷/۷۱ و اکسیژن محلول ۰,۳۴±۸/۲۷ میلی گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان از قسمت تکثیر ماهیان با میانگین وزنی ۰/۰۱± ۲۳/۴ گرم پس از طی عملیات رقم‌بندی تهیه شدند. توزیع بچه‌ماهیان به‌گونه‌ای انجام شد که از لحاظ زی‌توده (بیوماس)، اختلاف معنی‌داری در شروع آزمایش بین استخرها وجود نداشته باشد. قبل از ذخیره‌سازی، استخرها به‌وسیله‌ی مواد ضد عفونی نظیر هیپوکلریت سدیم به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت یک ساعت کاملاً ضدعفونی و سپس با آب شستشو داده شدند. ماهیان نیز ابتدا با محلول نمک ۴ درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی و سپس در داخل ۱۵ استخر بتنی با ابعاد ۲×۰/۸×۱ متر (آبگیری ۷۰۰ لیتر) به تعداد ۴۰ عدد در هر استخر قرار گرفتند. میزان دبی آب هر استخر ۵ ـ۴ لیتر در ثانیه و سرعت جریان آب در استخرها ۵ ـ۳ متر بر ثانیه در نظر گرفته شد.

۲ـ۲. ترکیب جیره و نحوه غذادهی

با توجه به تیمارهای تعیین شده، مکمل تجاری Optimun (ساخت شرکت Chemrofoma سوئیس) حاوی نوکلئوتید در ۵ سطح صفر (کنترل)، ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۱۵ و ۰/۲۰ درصد به جیره کنترل اضافه شد. آزمایش در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. جیره‌ی ماهیان بر اساس پودر ماهی به‌عنوان منبع اصلی پروتئین و انرژی ناخالص ۲۰۲۵ کیلوژول بر کیلوگرم (NRC, 1993) با استفاده از نرم‌افزار لیندو (Lindo copyright ۱۹۹۵ ،Releases ۶/۱) فرمول‌بندی شد (جداول ۱ و ۲). مکمل اپتیمون بر اساس دستورالعمل شرکت Chemoforma ابتدا با آب مخلوط و سپس به جیره پایه اضافه شد. در ادامه با مخلوط کردن اجزای جیره به مدت ۲۰ دقیقه در داخل مخلوط کن برقی، به‌منظور ساخت پلت (دانه‌بندی خوراک ۳ـ۲ میلی‌متر)، جیره به چرخ گوشت منتقل شد. پس از پلت‌سازی، پلت‌ها بر روی سینی‌های خشک‌کن قرار داده شده و به خشک کن انتقال داده شدند. جیره‌ها پس از آماده شدن در ظروف پلاستیکی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور قرار داده و برای غذادهی به ماهیان استفاده شد. غذادهی بچه ماهیان به‌میزان ۵ ـ۳ درصد وزن بدن و در ۵ وعده در ساعات ۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۸ انجام شد. مدفوع و دیگر مواد باقیمانده به‌طور روزانه از مخازن سیفون می‌شدند.

جدول ۱ـ ترکیب جیره ساخته شده برای تیمارهای مختلف

اجزای تشکیل دهنده (٪)	جیره پایه	٪۰/۰۵	٪۰/۱۰	٪۰/۱۵	٪۰/۲۰
پودر ماهی [a]	۴۳	۴۳	۴۳	۴۳	۴۳
آرد گندم	۱۸/۶۵	۱۸/۶۵	۱۸/۶۵	۱۸/۶۵	۱۸/۶۵
سویا	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶
روغن سویا [e]	۶	۶	۶	۶	۶
مکمل معدنی [d]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مکمل ویتامینی [c]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
ویتامین C [c]	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
ضد قارچ [e]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی کلسیم فسفات [f]	۱	۱	۱	۱	۱
سلولز[b]	۲	۱/۹۵	۱/۹۰	۱/۸۵	۱/۸۰
مکمل نوکلئوتید	۰	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۱۵	۰/۲۰
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۲ـ تجزیه تقریبی جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (AOAC, 1995)

نوع ترکیبات (٪)	میزان
پروتئین	۴۸/۲۵
چربی	۱۸/۸۶
رطوبت	۱۲/۴۱
خاکستر	۱۲/۲۵
کربوهیدرات	۸/۲۳
انرژی انرژی ناخالص (کیلو ژول بر کیلوگرم)	۲۰۲۵/۲۲

۳. اندازه‌گیری میزان کمپلمان‌های سرم

خون‌گیری در انتهای آزمایش (هفته هشتم) به‌صورت تصادفی از ۵ عدد ماهی در هر واحد آزمایشی به‌عمل آمد تا میزان کمپلمان‌های C_3 و C_4 در آنها مورد سنجش قرار گیرد. شایان ذکر است که یک روز قبل از خون‌گیری غذادهی قطع شد. برای این کار ابتدا ماهیان با استفاده از عصاره‌ی میخک با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر (Velisek et al., 2005) بیهوش گردیده و برای جلوگیری از ورود آب و موکوس به نمونه‌ی خون، ماهی خشک گردید. خون‌گیری از شریان دمی با قطع ساقه‌ی دمی صورت گرفت. برای این کار از تیوب‌های اپندروف فاقد ماده ضد انعقاد خون استفاده شد و سپس سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، جدا گردید. برای اندازه‌گیری سطح سرمی کمپلمان‌های C_3 و C_4 از کیت مخصوص موسسه زیست‌فناوری Nanjing چین و روش کدورت‌سنجی

ایمنی[1] استفاده شد. C_3 و C_4 سرم با آنتی بادی مخصوص کیت مخلوط شد و کمپلکس آنتی بادی ـ آنتی ژن تشکیل شد. میزان OD[2] در دستگاه اسپکتوفتومتر در طیف ۳۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با مقایسه‌ی این میزان با استاندارد کیت، میزان C_3 و C_4 بر حسب (µg/ml) محاسبه گردید.

۴. رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae*

باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد استفاده از یکی از همه‌گیری‌های بیماری استرپتوکوکوزیس در اطراف شهر شیراز در سال ۱۳۸۲ توسط اخلاقی و کشاورزی جدا گردیده و در بانک ژنی (FJ870987) ثبت شده بود. باکتری پس از جداسازی در محیط آزمایشگاه تحت دمای ۷۰ـ درجه سانتیگراد منجمد و در شرایط مناسب به آزمایشگاه دامپزشکی شهر لردگان انتقال یافت. پس از ذوب، باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۴ میلی لیتر محیط Tryptic Soy Broth کشت داده شد. سپس محیط سانتریفوژ شد و قسمت سطحی جدا گردید. قسمت زیرین دوباره در بافر فسفات[3] معلق‌سازی شد و سپس یکسان‌سازی کدورت سوسپانسیون میکروبی با لوله مک فارلین رقت CFU/ml ۹×۱۰۶ تهیه گردید، تزریق به مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر به‌صورت درون صفاقی انجام شد. غذادهی ماهیان با جیره‌ی قبلی حاوی مقادیر مختلف انجام شد. تلفات و علایم بیماری ماهیان تا ۲۱ روز پس از تزریق به‌صورت روزانه ثبت شد (Russo and Yanong, 2006).

۵. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

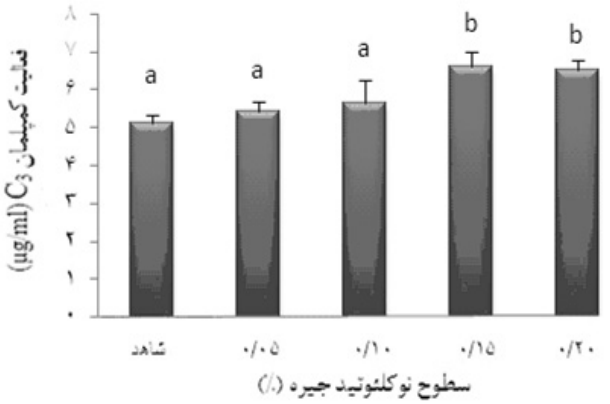
طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی[4]، برنامه‌ریزی و اجرا گردید. کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در هر مرحله در نرم‌افزار Excel (۲۰۰۷) ثبت و برخی موارد توصیفی بر حسب نیاز (نظیر بیومتری‌ها برای تعیین مقدار غذادهی جدید) در این برنامه انجام شد. سایر داده‌ها پس از کنترل همگی آنها به‌وسیله Kolmogronov-Smirnov، با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و تست Tukey به‌عنوان POST HOC، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها و عملیات مربوط به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS انجام شد (SPSS 16, Chicago, IL).

۶. نتایج

۶ـ۱. فعالیت کمپلمان‌های C_3 و C_4

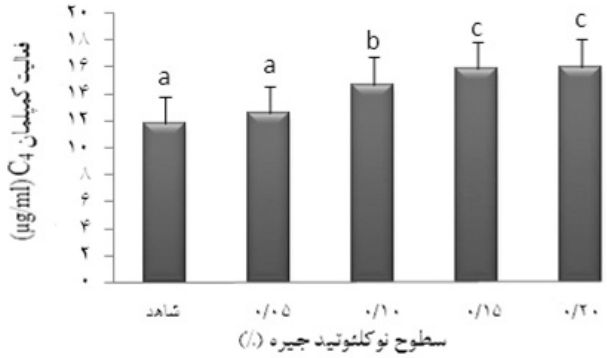
تلفاتی در گروه‌های آزمایشی طی ۸ هفته دوره‌ی آزمایش مشاهده نگردید. نمودار ۱ نتایج تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره را بر میزان کمپلمان C_3 ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته پرورش را نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج، حداکثر میزان کمپلمان C_3 سرم در تیمارهای ۰/۲۰ و ۰/۱۵ درصد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و سایر تیمارها داشتند ($P<0/05$). اختلاف معنی‌داری در میزان کمپلمان C_3 سرم بین گروه شاهد و تیمارهای ۰/۱۰ و ۰/۰۵ درصد مشاهده نشد ($P>0/05$).

نمودار ۲ نتایج تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره را بر میزان کمپلمان C_4 سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته پرورش را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج مذکور، افزایش معنی‌داری در میزان کمپلمان C_4 سرم در تیمارهای ۰/۲۰ و ۰/۱۵ درصد در مقایسه با گروه شاهد و تیمارهای ۰/۱۰ و ۰/۰۵ درصد مشاهده شد ($P<0/05$). اختلاف معنی‌داری در میزان کمپلمان C_4 سرم بین گروه شاهد و تیمارهای ۰/۰۵ درصد مشاهده نشد ($P>0/05$).



نمودار ۱ـ تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر میزان کمپلمان C_3 سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در پس از ۸ هفته پرورش

[1] Immunoturbidimetry
[2] Optical density
[3] Phosphate-buffered saline
[4] Completely Randomized Design



نمودار ۲ـ تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر میزان کمپلمان C_4 سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پس از ۸ هفته پرورش

۶ـ۲. رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae*

جدول ۳ نتایج تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره را بر میزان بازماندگی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae* پس از ۸ هفته پرورش را نشان می‌دهد.

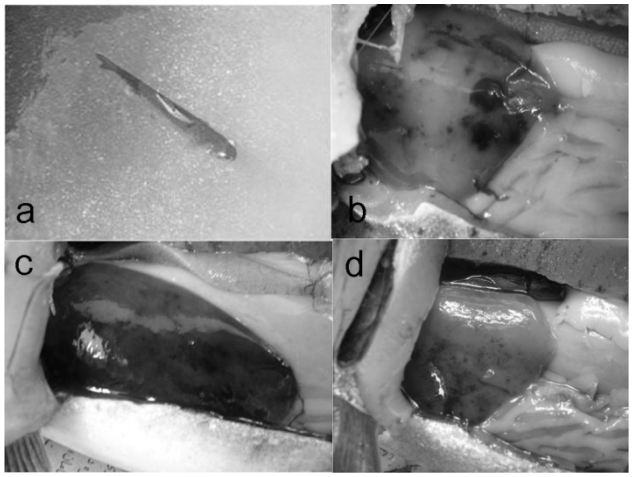
جدول ۳ـ نتایج تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۲۱ روز پس از رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae*

تیمار	میانگین بازماندگی %
شاهد	۱۵/۴۷±۲/۱۸ ^{c}
(٪) ۰/۰۵	۱۷/۷۵±۰/۸۸ ^{c}
(٪) ۰/۱۰	۳۶/۷۶±۱/۲۰ ^{b}
(٪) ۰/۱۵	۶۰/۳۴±۲/۸۸ ^{a}
(٪) ۰/۲۰	۶۲/۱۳±۱/۱۹ ^{a}

حروف غیر همسان ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P<0/05$).

بعد از روز سوم تزریق علایم بالینی شامل بی‌اشتهایی، سستی و بی‌حالی در برخی از ماهیان مشاهده گردید، علایم دیگر این بیماری پس از روز هفتم شامل: بیرون‌زدگی یک یا دو طرفه چشم‌ها، تیرگی رنگ بدن، کدورت و خونریزی در چشم‌ها، شنای نامتعادل و شنای عمودی (سر به طرف بالا)، خونریزی در قاعده باله‌ها، زخم‌های سطحی در بدن، خونریزی و پرخونی در کبد همراه با تورم و تیرگی رنگ، خونریزی در کلیه همراه با تورم، خونریزی در طحال همراه با بزرگ شدن و گرد شدن لبه‌های آن و نکروز اندامهای داخلی در برخی از ماهیان مشاهده شد (شکل ۱).

بر اساس نتایج به‌دست آمده بیشترین میزان بازماندگی در تیمارهای ۰/۲۰ و ۰/۱۵ درصد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها بود ($P<0/05$). بین گروه شاهد و تیمار ۰/۰۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$).



شکل ۱ـ علائم بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۷ روز پس از تزریق: تیرگی رنگ بدن، بیرون زدگی یک یا دو طرفه چشمها (a)، خونریزی خونریزی در کیسه شنا (b) و پرخونی در کبد همراه با تورم و تیرگی رنگ (c, d).

۷. بحث و نتیجه‌گیری

در ماهیان مورد مطالعه میزان ترکیبات کمپلمان C_3 و C_4 موجود در سرم در ماهیان تغذیه شده با مقادیر ۰/۲۰ و ۰/۱۵ درصد نوکلئوتید در جیره به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بوده است که با نتایج Misra و همکاران (۲۰۰۶) هم‌خوانی دارد. آنها گزارش کردند که میزان فعالیت کمپلمان در ماهی روهو تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵۰ میلی گرم β-glucan در یک کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بوده است. بر اساس نتایج کسب شده، میزان تلفات در رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae* در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۲۰–۰/۱۵ درصد نوکلئوتید از سایر تیمارها کمتر بود که در مقایسه با ماهیان گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. بازماندگی بعد از رویارویی با عوامل بیماری‌زای اصلی معمولا به‌عنوان "مقاومت در بیماری" شناخته شده است. نوکلئوتید جیره می‌تواند مقاومت ماهیان در برابر پاتوژن‌های مختلف از قبیل ویروس، باکتری‌ها و انگل‌ها را افزایش دهد. افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی در بسیاری از گونه‌ها از جمله در آزادماهیان (Burrells et al., 2001)، کپور معمولی (Sakai et al., 2001) و هیبرید باس راه‌راه (Li et al., 2004) گزارش شده است. نوکلئوتید جیره در قزل‌آلای رنگین کمان باعث افزایش میزان بازماندگی بعد از تزریق ویروس عفونت

لـوزالمعـده (IPN) (Leonardi et al., 2003) و بـــاکتـری Vibro anguillarum (Burrells et al., 2001) می‌شود.

Li و همکاران (۲۰۰۴) مشاهده نمودند که تغذیه ۸ هفته‌ای ماهی هیبرید باس راه‌راه با الیگونوکلئوتید RNA مخمر، تلفات را در رویارویی با باکتری *Streptococcus iniae* کاهش می‌دهد. همچنین Russo و Yanong (۲۰۰۶) مشاهده کردند که نوکلئوتید جیره باعث کاهش تلفات با این باکتری در ماهی کوسه سیاه دم قرمز (*Epalzeorhynchos bicolor*) می‌شود. نتایج این آزمایشات با نتایج تحقیق حاضر منطبق است.

مطالعه Low و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که بیان ترکیبات ایمنی اختصاصی مثل ایمونوگلبولین (IgM) و ژن فعال‌کننده recombinase (RAG-1) به‌طور معنی‌داری در آبشش و طحال توربوت تغذیه شده با جیره‌ی حاوی نوکلئوتید افزایش یافت. نوکلئوتیدهای جیره می‌توانند از طریق افزایش بلوغ، فعالیت و تکثیر لنفوسیت‌ها، فعالیت ماکروفاژها نظیر فعالیت بیگانه‌خواری و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی، تکثیر گلبول‌های قرمز و سفید، پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و بیان ژن‌های ایمنی باعث بالا رفتن سامانه‌ی ایمنی در ماهیان شود (Gil, 2002). از سال‌ها پیش، فعالیت ضد میکروبی در سرم و موکوس ماهی شناخته شده است. بعدها مشخص شد که این فعالیت ناشی از وجود کمپلمان‌ها و آنتی بادی است. با توجه به افزایش عوامل ایمنی شامل میزان کمپلمان C_3 و C_4 در سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی نوکلئوتید می‌توان این گونه بیان کرد که احتمالاً کاهش تلفات در این ماهیان پس از معرض درگیری با باکتری *Streptococcus iniae* ناشی از افزایش این عوامل است. تحقیقات نشان داده است که احتمالاً نوکلئوتیدها در بخش مدیریت بهداشتی آبزیان و کاهش خطر بیماری‌های عفونی در صنعت آبزی‌پروری بسیار سودمند است. نتایج این تحقیق نشان داد که اضافه کردن نوکلئوتید به جیره‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سطوح ۰/۲۰ و ۰/۱۵ درصد اثرات مثبتی بر میزان کمپلمان C_3 و C_4 و بازماندگی پس از رویارویی با باکتری *S. iniae* در ماهی مورد مطالعه دارد. بنابراین استفاده از نوکلئوتید به میزان ۰/۲۰ درصد در جیره در مناطقی با شیوع بالای بیماری پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به‌دلیل پشتیبانی مالی بخشی از آزمایشات این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر به‌عمل می‌آید. همچنین از آقایان دکتر صادقی و مهندس خسروی به‌دلیل همکاری موثرشان سپاسگزاریم.

منابع

Agnew, W.; Barnes, A.C., 2007. *Stereptococcus iniae*; An aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. Journal of veterinary microbiology. 122 : 1-15.

AOAC., 1995. Association of Official Analytical Chemists, 16th (end), Procedure 984. 25.

Boshra, H.L.J.; Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology. 20: 239-262.

Boza, J., 1998. Nucleotide in infant nutrition. Monatsschr Kinderheilkd. 146: 39-48.

Burrells, C.; William, P.D.; Southage, P.J.; Wadsworth, S.L., 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. Aquaculture. 199: 171-184.

Cosgrove, M., 1998. Nucleotides. Nutrition. 14, 748–751.

Danilova, N., 2006. The evolution of immune mechanisms. Journal of Experimental Zoology, Part B Molecular and Developmental Evolution. 306:496-520.

Fanouraki, E.; Divanach, P.; Pavlidis, M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture. 265: 294-304.

Gatlin, D.M., 2002. Nutrition and fish health. In. Halver, J.E., Hardy, R.W. (eds) Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, California. 671-702.

Gil, A., 2002. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. Eur. Clinology. Nutrition. 56(3): S1-S4.

Leonardi, M.; Sandino, A.M.; Klempau, A., 2003. Effect

Montero, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Vergara, J.V.; Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthed seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture. 171: 269-278.

National Research Council (NRC)., 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington.

Russo, R.; Yanong, R.P.E., 2006. Dietary beta-glucans and nucleotides enhance resistance of red-tail black shark (*Epalzeorhynchos bicolor*, fam. Cyprinidae) to Streptococcus iniae infection. Journal of the World Aquaculture Society. 37: 298-306.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.

Sakai, M.; Taniguchi, K.; Mamoto, K.; Ogawa, H.; Tabata, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Fish Disease. 24: 433–438.

Velisek, J.; Svobodova, Z. and Piaakova, V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). ACTA VET, BRNO. 74: 139-146.

of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology. 23: 52–59.

Li, P.; Gatlin III, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. Aquaculture. 251: 141–152.

Li, P.; Lewis, D.H.; Gatlin III, D.M., 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* and *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish Shellfish Immunology. 16: 561-569.

Low, C.; Wadsworth, S.; Burrells, C.; Secombes, C.J., 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmu smaximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. Aquaculture. 221: 23-40.

Magnadottir B., 2006: Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20:137-151.

Misra, C.K.; Kumar, D.B.; Mukherjee, S.C.; Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohita fingerlings. Aquaculture. 255: 82–94.