مطالعه اثرات ماکروگارد بر پارامتر های رشد، خونی و پاسخ های ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مواجهه یافته با باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*)

پور مظفر، س.[۱*]، نفیسی بهابادی، م .[۱]، مهاجری، ژ.[۲]، محمدی، م.[۱]، سلیمی بجستانی، م. ر.[۳]

دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۰۵ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۳

خلاصه

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر تجویز خوراکی بتاگلوکان استخراج شده از مخمر ساکارومایسس سروزیه (ماکروگارد) به میزان ۱و ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا بر فاکتورهای رشد و پارامترهای خونی شامل میزان هماتوکریت، هموگلوبین، MCV ، MCH ، MCHC و تعداد کلی گویچه های قرمز و سفید ماهی قزل آلای رنگین کمان (۲/۵۰±۲۸/۲۰ گرم) می باشد. ماهیان انتخابی به ۳ تیمار شامل تیمار شاهد و تیمارهای ماکروگارد تقسیم شدند. در پایان دوره آزمایش (۴۵ روز) خون گیری از ماهیان به عمل آمد و پارامترهای خونی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی ماکروگارد نسبت به تیمار شاهد اثر مثبت و معنی داری داشت ($p<0/05$). سنجش پارامترهای خونی همچون هماتوکریت، هموگلوبین، MCV ، MCH و MCHC تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشت ($p>0/05$). افزایش معنی دار تعداد گویچه های سفید در تیمارها نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($p<0/05$). در شمارش افتراقی گویچه های سفید، تعداد نوتروفیل ها در تیمارهای حاوی ماکروگارد اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد ($p<0/05$). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تجویز خوراکی ماکروگارد موجب افزایش رشد و بهبود پاسخ های ایمنی ماهی از طریق تکثیر گویچه های سفید خون به خصوص جمعیت نوتروفیلی قزل آلای رنگین کمان شده و مقاومت در برابر استرس های محیطی و عوامل بیماری زا می گردد.

واژه‌های کلیدی: ماکروگارد، نوتروفیل، فاکتورهای رشد، ماهی قزل آلای رنگین کمان.

۱. گروه شیلات و تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.

۲. گروه شیلات و تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات دانشگاه عالی شهر، بوشهر، ایران.

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: **sajjad5550@gmail.com**

مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از گونه های مهم اقتصادی است که در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می شود. لیکن پرورش متراکم این ماهی با استرس ها ی مختلف همراه می باشد و ماهی ر ا در برابر بیمار ی ها ی مختلف (ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی) مستعد می نماید (Bahram و همکاران، ۲۰۰۵). محرک های ایمنی موجب افزایش سود و کاهش پاسخ های مضر نسبت به فعالیت یا سرکوب سیستم ایمنی می شود (Djordjevic و همکاران، ۲۰۰۹؛ Russo و همکاران، ۲۰۰۶؛ Vetvicka and Yvin, ۲۰۰۴؛ Whittington و همکاران، ۲۰۰۵).

یکی از موادی که امروزه به عنوان محرک ایمنی مورد استفاده قرار می گیرد، مخمرها است که به شکل زنده جهت تغذیه ارگانیزم های غذایی زنده به عنوان پروبیوتیک و یا پس از فرآوری به صورت اجزای غذایی استفاده می گردد. بتاگلوکان ها مهمترین ترکیب استخراج شده از مخمرها می باشد (Djordjevic و همکاران، ۲۰۰۹). بتاگلوکان ها، پلی‌مرهای گلوکز هستند که به عنوان ترکیبات ساختاری در غشای سلولی باکتری ها، گیاهان و مخمرها حضور دارند و با تحریک واکنش‌های ایمنی موجب کاهش استرس و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی می شوند (Whittington و همکاران، ۲۰۰۵؛ Vetvicka and Yvin, ۲۰۰۴). سویه ساکارومایسس سروزیه در قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده به صورت روزانه موجب تحریک واکنش های ایمنی غیر اختصاصی مانند فاگوسیتوزیس، بهبود مقاومت ماهی در برابر استرس های محیطی و پاتوژن ها می شود (Bagni و همکاران، ۲۰۰۵؛ Duncan and Klesius, ۱۹۹۶؛ Wang and Wang ، ۱۹۹۶). عملکرد مخمر ساکارومایسس سروزیه به نوع سویه مورد استفاده، بستگی دارد (Fietto و همکاران، ۲۰۰۴). در این راستا هدف از این مطالعه، بررسی تجویز خوراکی بتاگلوکان استخراج شده از مخمر با نام تجاری ماکروگارد بر روی رشد و فاکتورهای خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان است.

مواد و روش کار

تأمین ماهی: ۱۳۵ ماهی قزل آلای رنگین کمان به ظاهر سالم با وزن تقریبی۲۸/۲۰±۲/۵۰ از مزارع تکثیر و پرورش ماهی استان اصفهان خریداری و در تانک های مخصوص حمل ماهی با تزریق اکسیژن خالص به محل اجرای پروژه (دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر) انتقال داده شد. ماهیان در ۹ آکواریوم ۶۴ لیتری (با ابعاد ۴۰ × ۴۰ سانتی متر طول و عرض و ارتفاع آبگیری ۴۰ سانتی متر) به طور مساوی و پس از زیست سنجی اولیه نگهداری شدند. چیدمان آکواریوم‌ها به صورت تصادفی انتخاب شده بود تا تیمارها و تکرارهای مختلف در شرایط یکسان محیط آزمایشگاهی قرار گیرند. همچنین دوره سازگاری به محیط آزمایشگاه طی ۷ روز انجام شد.

فاکتورهای کیفی آب: آب مورد نیاز از طریق یک حلقه چاه آب شیرین در محل انجام پژوهش تأمین و جهت کاهش آب در گردش از یک سیستم مرکزی هوادهی از نوع هواده حلزونی با قدرت ۰/۴ کیلو وات، دبی هوای خروجی ۱/۳ متر مکعب در دقیقه و فشار خروجی ۱۱۰ میلی بار استفاده شد این هواده میزان اکسیژن تانک ها را در طول دروه آزمایش در حد اشباع نگه داشت. عوامل فیزیکو شیمیایی آب شامل درجه حرارت، اکسیژن محلول و pH همه روزه به وسیله دستگاه های دیجیتال قابل حمل مارک WTW با دقت اندازه گیری ۰/۰۱ اندازه گیری شد. اکسیژن محلول بین ۷ – ۹ میلی گرم در لیتر ثبت شد. pH آب حدود ۷,۲۵ – ۸,۱۵ قرار داشت. دامنه تغییرات درجه حرارت آب نیز به دلیل نوسانات شدید دمایی محیط در طول دوره آزمایش بین ۱۱ – ۲۰ سانتیگراد ثبت گردید.

غذادهی: جیره غذایی به صورت اکسترودر[1] با علامت اختصاری (EX-TG) از شرکت تعاونی ۲۱ بیضاء خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. متوسط ترکیبات غذایی، پروتئین خام ۴۵٪، چربی خام ۱۴٪، فیبر خام ۲٪، رطوبت ۱۰٪ و قطر خوراک ۲/۲– ۲/۴ میلیمتر بود. ماهیان ۱/۵ درصد وزن توده زنده (Biomass) که در دو نوبت صبح و بعد از ظهر به ماهیان خورانده می شد. بتاگلوکان (محرک ایمنی) استفاده شده در این پژوهش مخمر ساکارومایسس سروزیه با نام تجاری ماکروگارد[2] (Biotec pharmacon ASA, Troms, Norway) بود که به روش خوراکی تجویز شد. مواد تشکیل دهنده ماکرووگارد، مخمر، شامل ۶۰٪ بتاگلوکان (β-1,3/1,6-glucan)، ۸٪ پروتئین، ۱۲٪ خاکستر و ۹٪ رطوبت می باشد. ۱ و ۲ گرم مخمر به ازای هر کیلوگرم غذا با روغن ماهی کاد (۳۲ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم غذا) پوشش دار شد و سپس سوسپانسیون مخمر و روغن به غذا اسپری گردید (Couso، ۲۰۰۳؛ Mirsa و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wache و همکاران، ۲۰۰۶ Waché و همکاران، ۲۰۰۶).

خون گیری: نمونه گیری از خون ماهیان بی هوش شده (از هر تکرار ۲ عدد) با اسانس گل میخک (تهیه شده از شرکت آیت اسانس) بعد از زیست سنجی با فرو بردن سرنگ ۲/۵ میلی لیتری آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین در سیاهرگ دمی[3] به روش حذفی و ۴۵ روز بعد از تجویز ماکروگارد (پیشنهاد شرکت سازنده) (Bagni و همکاران، ۲۰۰۵) انجام پذیرفت. شمارش گلبول های سفید[4] و

1. Extroder
2. Macrogard
3. Caudal vein
4. WBC (White Blood Cell)
5. RBC (Red Blood Cell)
6. Dacies fluid

گلبول های قرمز[5] با استفاده از محلول دایسیس[6] با رقیق کردن خون با غلظت ۱:۵۰ از طریق لام هموسیتومتر انجام پذیرفت. شمارش افتراقی گلبول های سفید با تهیه اسمیر[7] (گسترش خونی) و رنگ آمیزی گیمسا ۵ درصد (ARJ:1013) به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد (تصویر ۱و۲) (حقیقی، ۱۳۸۸).

بیماری زایی و تعیین درصد بقاء

پس از گذشت ۴۵ روز، به منظور ارزیابی میزان مقاومت ماهیان و تأثیر ماکروگارد، به مدت ۵ دقیقه در حمام باکتریایی *استرپتوکوکوس اینیایی* با غلظت 10^8در هر میلی لیتر سلول تهیه شده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، قرار داده شدند. سپس از ماهیان به مدت ۱۰ روز نگهداری و تلفات روزانه ثبت گردید.

اندازه گیری هماتوکریت

برای این مهم از لوله میکروهماتوکریت استفاده شد، ابتدا ۳/۴ لوله هماتوکریت را از نمونه خون پر کرده و پس از مسدود نمودن آن با خمیر هماتوکریت، لوله را در دستگاه میکروسانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ – ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس میزان هماتوکریت با استفاده از خط کش مخصوص هماتوکریت اندازه گیری شد (حقیقی، ۱۳۸۸).

متوسط حجم گلبول های قرمز: واحد آن نانومتر مکعب یا فمتولیتر بوده و با استفاده از رابطه زیر بدست می آید:

$$MCV=\frac{\text{۱۰*هماتوکریت}}{\text{تعداد گلبول های قرمز بر حسب میلیون}}$$

متوسط وزن هموگلوبین گلبول های قرمز : واحد آن پیکوگرم بوده و با استفاده از رابطه زیر بدست می آید:

$$MCH=\frac{\text{۱۰*هموگلوبین}}{\text{تعداد گلبول های قرمز بر حسب میلیون}}$$

متوسط غلظت هموگلوبین سلولی: بر حسب درصد بیان می شود و از رابطه زیر بدست می آید:

$$MCHC=\frac{\text{۱۰۰*هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}}$$

اندازه گیری هموگلوبین: اندازه گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین بر مبنای همولیز گلبول قرمز در محلول درآبکین[8] (ترکیبی از ۲۰۰ میلی گرم فری سیاناید پتاسیم، ۵۰ میلی گرم سیاناید پتاسیم و ۱۰۰۰ میلی گرم بی کربنات سدیم در یک لیتر آب مقطر) و آزاد شدن هموگلوبین است. برای این کار ابتدا ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون به ۵ میلی لیتر محلول درآبکین اضافه و مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (حقیقی،۱۳۸۸).

اندازه گیری شاخص های رشد

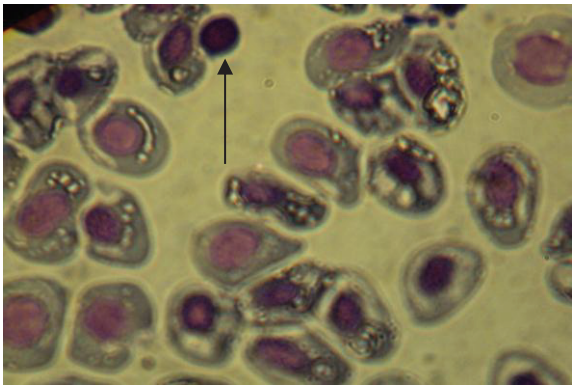
وزن هر ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتال AND مدل C0006 با دقت ۰/۰۱ گرم (ساخت کشور ژاپن) اندازه گیری شد. طول متوسط، وزن متوسط، میزان رشد روزانه، ضریب رشد ویژه[9]، راندمان تبدیل غذایی و ضریب تبدیل غذایی[10]از جمله مهمترین فاکتور هایی بودند که مورد بررسی قرار گرفت.

تعداد ماهی ها / وزن کل ماهی ها= وزن متوسط

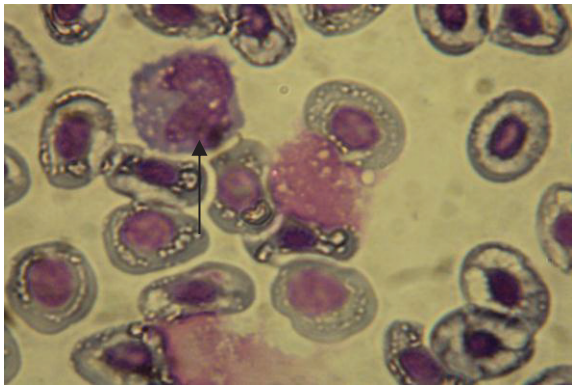
تعداد روزهای پرورش / افزایش وزن متوسط ماهی ها= میزان رشد یا افزایش وزن روزانه

۱۰۰*[تعداد روزهای پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)]= ضریب رشد ویژه

افزایش وزن توده زنده / مقدار غذای مصرفی = ضریب تبدیل غذایی



تصویر۱. لنفوسیت (فلش) قزل آلای رنگین کمان با بزرگنمایی(7000x). رنگ آمیزی شده با گیمسا ۵ درصد.



تصویر۲. نوتروفیل (فلش) قزل آلای رنگین کمان با بزرگنمایی(7000x). رنگ آمیزی شده با گیمسا ۵ درصد.

7. Smear
8. Drabkin
9. Specific Growth Rate
10. Feed Conversion Rate

روش آماری مورد استفاده

اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار تعیین شد و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین ها از تست چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از رشد بچه ماهیان در تیمارهای مختلف در طی یک دوره ۴۵ روزه در جدول ۲ نمایش داده شده است. براساس نتایج مذکور بیشترین رشد ثانویه در تیمار های حاوی ماکروگارد مشاهده شد (p<۰/۰۵).. بیشترین افزایش رشد روزانه در تیمار حاوی ۲ گرم ماکروگارد ثبت گردید و کمترین میزان در تیمار شاهد بود (p<۰/۰۵). از نظر ضریب رشد ویژه تفاوت معنی داری بین و میان تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵).کاهش معنی داری از لحاظ ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی ۲ گرم ماکروگارد نسبت به تیمار شاهد ثبت شد (p<۰/۰۵).

بازماندگی و درصد بقاء بعد از مقابله با باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*

بعد از حمام باکتریایی و نگهداری ماهیان به میزان ۱۰ روز، میزان بقاء در تیمار شاهد ۴۸٪ در حالی که در تیمار ۲ گرم ماکروگارد ۶۲ درصد به ثبت رسید که تفاوت معنی داری با تیمار شاهد داشت (p<۰/۰۵). همچنین میزان بقاء در تیمار حاوی ۱ گرم ماکروگارد ۵۱٪ و فاقد اختلاف معنی دار با تیمار شاهد بود (۰p>۰/۰۵) (جدول۱).

	تیمار شاهد	تیمار ۱ گرم ماکروگارد	تیمار ۲ گرم ماکروگارد
وزن اولیه (gr)	۳۰/۱۰±۱/۷۴^{a}	۲۷/۶۱±۴/۱۱^{a}	۲۶/۳۱±۰/۵۴^{a}
وزن نهایی (gr)	۴۶/۷۲±۰/ ۵۹^{a}	۴۸/۱۴±۱/۳۹^{b}	۴۹/۲۴±۰/۳۸^{b}
افزایش وزن (gr)	۱۶/۶۲±۱/۶۲^{b}	۲۰/۵۳±۴/۲۱^{a}	۲۲/۹۳±۰/۹۱^{a}
رشد روزانه (gr)	۰/۳۷±۰/۰۳۷^{b}	۰/۴۶±۰/۱۲^{b}	۰/۵۱±۰/۰۲^{a}
ضریب رشد ویژه	۰/۹۸±۰/۱۲^{a}	۱/۲۵±۰/۳۹^{a}	۱/۳۹±۰/۰۶^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۱۶±۰/۱۱^{b}	۱/۱۲±۰/۲۹^{b}	۰/۸۸±۰/۰۳^{a}
بازماندگی بعد از بیماری (٪)	۴۸/۶۷±۱۴^{b}	۵۱±۶/۵۱^{b}	۶۲/۶۷±۳/۴۶^{a}

جدول۱: شاخص های رشد (میانگین ± انحراف معیار) قزل آلای رنگین کمان در طول دوره پرورش (n=۱۵). میانگین ها در هر ردیف با حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی دار را نشان می دهد (p<۰/۰۵).

	تیمار شاهد	تیمار ۱ گرم ماکروگارد	تیمار ۲ گرم ماکروگارد
گویچه قرمز × (۱۰^{۳}) عدد در هر میلی متر مکعب	۸۴۷±۹۲/۰۴^{b}	۸۸۶±۴۰/ ۲۸^{ab}	۹۱۶/۶۷± ۲۳/ ۵۹^{a}
گویچه سفید قرمز × (۱۰^{۳}) عدد در هر میلی متر مکعب	۱۲/۳±۲/۱۳^{b}	۱۳/۵۰±۱/۲۱^{a}	۱۲/۷۳±۲/۴۸^{ab}
هماتوکریت (درصد)	۳۵/۶۶±۵/۲۸^{a}	۳۳/۵±۲/۴۱^{a}	۳۶±۱/۴۲^{a}
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۷/۲۲±۱/۷۶^{a}	۶/۵±۰/۸۱^{a}	۷/۴۱±۰/۵۸^{a}
حجم گویچه های قرمز	۳۹۶/۷۵±۲۱/۴۵^{a}	۳۵۹/۵±۳۷/۵۵^{a}	۳۹۴/۳۶±۵/۳۴^{a}
وزن هموگلوبین گویچه ها	۷۹/۶۵±۱۱/۶۳^{a}	۷۴/۴۴±۵/۹۵^{a}	۸۱/۰۸±۴/۲۹^{a}
درصد غلظت هموگلوبین گویچه	۲۰/۰۵±۱/۹۳^{a}	۱۹/۳۵±۱/۰۵^{a}	۲۰/۵۵±۰/۸۱^{a}
درصد لنفوسیت	۹۰/۳۳±۴/۰۴^{a}	۹۱/۶۶±۲/۵۲^{a}	۹۱/۶۶±۴/۵۱^{a}
درصد نوتروفیل	۳/۶۷±۲/۸۹^{b}	۶/۵۳±۲/۵۲^{a}	۷±۴/۵۸^{a}

جدول۲: شاخص های خونی (میانگین ± انحراف معیار) قزل آلای رنگین کمان در طول دوره پرورش (n=۱۵). میانگین ها در هر ردیف با حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی دار را نشان می دهد (p<۰/۰۵).

شمارش لکوسیتی

نتایج حاصل از شمارش گویچه های قرمز و سفید، اندازه گیری هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول های قرمز، وزن هموگلوبین داخل گویچه، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی و شمارش افتراقی گلبول های سفید در جدول ۲ نمایش داده شده است. نتایج به دست آمده در تیمارهای ماکروگارد نشان می دهد پارامترهای خونی شامل هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول های قرمز، وزن هموگلوبین داخل گویچه، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد نداشتند (p>۰/۰۵). گویچه های سفید در تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۵). در شمارش افتراقی گویچه های سفید، تعداد نوتروفیل ها در تیمارهای ماکروگارد افزایش و اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه تجویز خوراکی ماکروگارد (۱و ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) موجب افزایش رشد نهایی، تحریک برخی از پاسخ های ایمنی نسبت به گروه شاهد شد. ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی ماکروگارد نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری را نشان داد (جدول۲). نتایج این مطالعه با سایر محققین در ارتباط با تأثیر بتاگلوکان بر روی فاکتورهای رشد، تطابق دارد. تجویز خوراکی بتاگلوکان اثر مثبتی بر روی فاکتورهای رشد، ایمنی و بقای بچه ماهی کپور هندی در برابر اواردوزیلا تاردا[11] و آئروموناس هیدروفیلا[12] دارد (Misra و همکاران، ۲۰۰۶).

افزایش رشد با تجویز خوراکی بتاگلوکان در ماهی اسنپر[13] گزارش شده است(Cook و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین نتایج نشان می دهد که تجویز بتاگلوکان ممکن است بر روی فاکتورهای رشد و راندمان تبدیل غذایی در هیبرید ماهی باس راه راه[14] تأثیر گذار باشد (Jaramillo and Gatlin، ۲۰۰۴). از طرفی، در تحقیقی دیگر افزایش رشد میگوی مونودون تغذیه شده با بتاگلوکان به ثبت رسید (Chang و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین علی رغم تأثیر متبت گلوکان در رشد آبزیان، دلیل افزایش وزن ناشی از گلوکان هنوز مشخص نشده است (Ai و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین نتایج سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که رژیم های غذایی حاوی مواد محرک ایمنی (نظیر ویتامین C و E، بتاگلوکان و ارگوسان) در پارامترهای رشد ماهی سی باس[15] ، ماهی شانک[16] و ماهی آزاد اقیانوس اطلس[17] افزایش معنی داری نداشته است(Bagni و همکاران، ۲۰۰۵؛ Efthimiou، ۱۹۹۶؛ Hardie، ۱۹۹۰ و ۱۹۹۱).

با توجه به نتایج به دست آمده، بتاگلوکان (ماکروگارد) تأثیر چندانی بر هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC نداشت. افزایش تعداد گویچه های قرمز در تیمار ۲ گرم ماکروگارد مشاهده شد (p<۰/۰۵). این فرضیه مطرح است که مواد محرک ایمنی موجب افزایش متابولیسم در ماهی شده در نتیجه تعداد و ظرفیت حمل اکسیژن در گویچه های قرمز افزایش می یابد (Irianto and Austin، ۲۰۰۲). تغذیه ماهی اسکار[18] با مخمر موجب افزایش معنی داری در تعداد گویچه های قرمز می شود (Firouzbakhsh و همکاران، ۲۰۱۱) که با نتایج این پژوهش مطابقت و همخوانی دارد. همچنین مصرف ماکروگارد در تیمارهای مختلف موجب افزایش معنی دار جمعیت نوتروفیل های خونی در مقایسه با تیمار شاهد شد ولی در جمعیت لنفوسیتی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در مطالعه ای مصرف خوراکی بتاگلوکان در ماهی قزل آلای رنگین کمان موجب افزایش معنی دار جمعیت نوتروفیل های خونی و کاهش لنفوسیت ها گردید (Jeney و همکاران، ۱۹۹۷).

همچنین بیشتر مطالعات گذشته نشان می دهد که استفاده خوراکی از بتاگلوکان موجب افزایش توانایی ماکرفاژها در محیط طبیعی و آزمایشگاهی، مهاجرت نوتروفیلی و فاگوسیتوز می شود (Duncan and Klesius ، ۱۹۹۶؛ Jorgensen and Robertsen ، ۱۹۹۵؛ Secombes، ۱۹۹۴؛ Wang and Wang ، ۱۹۹۶). زمانی که بتاگلوکان ها به گیرنده های بتاگلوکانی موجود در ماکروفاژها و نوتروفیل ها متصل می شود موجب تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم ها می شود که در نتیجه فعالیت ضد استرس و هجوم به عوامل باکتریایی افزایش پیدا می کند (Kim و همکاران، ۲۰۰۹). در تحقیقی دیگر سیستم ایمنی اختصاصی با تجویز خوراکی بتاگلوکان ها به طور غیر مستقیم موجب تحریک فعالیت های لنفوسیتی در ماهی توربت و قزل آلای رنگین کمان شد (DeBaulny و همکاران ، ۱۹۹۶؛ Verlhac و همکاران، b۱۹۹۸) . بنابراین تجویز بتاگلوکان ها در رژیم غذایی موجب افزایش مقاومت گونه های ماهی در برابر آلودگی های باکتریایی یا پروتوزایی می شود (Efthimiou ، ۱۹۹۶؛ Robertsen، ۱۹۹۹). در این مطالعه درصد بازماندگی ماهیان پس از آلودگی به بیماری اختلاف معنی داری را نشان داد به طوری که تیمار ۲ گرم ماکروگارد با دارا بودن ۶۲ درصد بیشترین بازماندگی را دارا بود. در مطالعه ای، کمترین میزان مرگ و میر

15. *Dicentrarchus labrax*
16. *Dentex dentex*
17. *Salmo salar*
18. *Astronotus ocellatus*

11. Edwardsiella tarda
12. Aeromonas hydrophila
13. *Pagrus auratus*
14. *Morone chrysops* M. saxatilis*

ماهی سیم دریایی در مقابل بیماری Pasteurellosis با اضافه کردن یک گرم بتاگلوکان در جیره غذایی به دست آمد (Couso، ۲۰۰۳). اما در برخی از موارد مصرف گلوکان در گربه ماهی تأثیر چندانی بر بقای این ماهی در مقابل آلودگی ادوارد زیلا نداشته است (DeBaulny و همکاران، ۱۹۹۶). همچنین بتاگلوکان به تنهایی در بهبود پاسخ های ایمنی و مقاومت ماهی تیلاپیا در برابر آلودگی با استرپتوکوکوزیس مفید نیست بلکه بهترین مکمل، واکسن استرپتوکوکوزیس در افزایش واکنش های ایمنی در تیلاپیا در مقابل آلودگی باکتریایی است (Whittington و همکاران، ۲۰۰۵).

نتیجه گیری نهایی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تجویز خوراکی ماکروگارد موجب افزایش رشد نهایی در ماهی قزل آلا می شود. به علاوه مصرف خوارکی ۲ گرم ماکروگارد در افزایش مقاومت ماهیان در برابر سپتی سمی ناشی از *استرپتوکوکوس اینیایی* نقش مؤثری داشته و موجب بهبود پاسخ های ایمنی ماهی از طریق تکثیر گویچه های سفید خون به خصوص جمعیت نوتروفیلی قزل آلای رنگین کمان شد. نتایج این مطالعه می تواند به سایر ماهیان آب شیرین تعمیم داده شود و مورد استفاده قرار گیرد. به هر حال میزان این تأثیرات بستگی به شرایط پرورشی و نگهداری ماهیان دارد زیرا فاکتورهای زیادی از جمله کیفیت آب به ویژه دمای آب، تغذیه، مدیریت پرورشی، عوامل استرس زا در کارایی مواد محرک ایمنی اثرات قابل توجهی دارند. بنابراین در عمل توصیه می شود تا در مزارعی که با مشکل و خطر بروز بیماری استرپتوکوکوزیس مواجه هستند، از مواد محرک ایمنی نظیر ماکروگارد نیز برای تقویت سیستم ایمنی استفاده نمایند.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر تقدیر و تشکر نموده و همچنین از مدیر گروه محترم شیلات جناب آقای دکتر داوودی برای همکاری صمیمانه ایشان در اجرای این طرح کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

Journal of Veterinary Laboratory Research 6 (2014) 27-36

Effects of Macrogard on growth, haematological parameters and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Challenged with *Streptococcus iniae*

Pourmozaffar, S.[1]*, Nafisi Bahabadi, M.[1], Mohajeri, J.[2], Mohammady, M.[1], Salimi Bejestani, M.R.[3].

Received: 27.09.2013 Accepted: 25.08.2014

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of orally administered β-glucan (Macrogard) extracted from *Saccharomyces cerevisiae* (Macrogard) 1 and 2 gr per kg of feed on growth factors and hematological parameters including hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, total red and white blood cells of rainbow trout (28.20± 2.50 gr). The fish were divided into 3 groups including control and Macrogards treatments. At the end of the experimental period (45 days) Bloods were taken and bloods parameters were evaluated. The results showed that the fish growth and FCR in Macrogard treatments were significantly positive compared to control treatment (p< 0/05). Measurement of blood parameters such as hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC was not significantly different from control (p>0/05). A significant increase in the number of white blood cells in the treatments compared to the control was observed (p<0/05). The differential count of white blood cell, neutrophil count in Macrogards treatments showed significantly different with control (p<0/05). The results of this study showed that the oral administration of Macrogard enhances growth and improves the immune responses of fish, through the proliferation white blood cells particularly neutrophils population of rainbow trout and resistance to environmental stress and pathogens.

Key words: Macrogard, Neutrophil, Growth parameter, Rainbow trout.

1.Fisheries Department of Agricultural and Natural Resources College, Persian Gulf University, Boshehr- Iran.

2. Fisheries Department of Agricultural and Natural Resources College, Islamic Azad University, Boshehr- Iran.

3 . Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan- Iran.

*Corresponding author: **sajjad5550@gmail.com**

منابع

حقیقی، م. ۱۳۸۸. روش های آزمایشگاهی خون شناسی ماهی. انتشارات علمی آبزیان، ۸۳ صفحه.

Ai,Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu. 2007. Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Fish and Shellfish Immunology.**22**,394-402.

Bahram, s., Roodsari, H., Nazari, R.M., Javadian, R. 2005. Efect of Levamisole on survival rate of the Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. Journal of marine science and technology **4**, 1-9.

Bagni, M., Romano, M.G., Finoia, L., Abelli, G. 2005. Short and long-term effects of a dietary yeast β-1,3-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Shellfish Immunol **18**, 311-325.

Chang, C., Chen, H.Y., Su, MS. 2000.Immunomodulation by dietary in the brooders of the grass prawn (*Penaeus monodon*). Fish Shellfish Immunol. **10**,505-514.

Cook, M.T., Hayball, P.J., Hutchinson, W., Nowak, B.F., Hayball, J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae (*Bloch and Schneider*) in winter. Fish Shellfish Immunology **14**, 333-345.

Couso, N. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture. **219**, 99-109.

DeBaulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Le Gouvello, R. 1996. Effect of long-term oral administrationn of β-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). Disease of Aquatic Organism **26**, 139-147.

Djordjevic, B., kugor, S., Jorgensen, S., overland, M., Mydland, L., Krasnov, A. 2009. Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. Fish & Shellfish Immunology **26**, 201-209.

Duncan, P.L., Klesius, P.H. 1996. Dietary immunostimulants enhance non-specific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Aquatic Animal Health **8**, 241-248.

Efthimiou, S. 1996. Dietary intake of β-1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (Dentex dentex), Sparidae effects on growth performance,mortalities and non-specific defense mechanisms. Applied Ichthyology **12**, 1-7.

Fietto, J.L.R., Araujo, R.S., Valadao, F.N., Fietto, L.G., Brandao, R.L., Neves, M.J., Gomes, F.C.O.,

Nicoli, J.R., Castro, I.M. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and Saccharomyces boulardii. Canadian Journal of Microbiology **50**, 615-621.

Firouzbakhsh, F., Noori, f., Khalesi, M.K., Jani-Khalili, K. 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry **37**, 833-842.

Hardie, L., Fletcher, T., Secombes, C. 1990. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture **87**, 1-13.

Hardie, L., Fletcher, T., Secombes, C. 1991. The effect of dietary vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture **95**, 201-214.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Probiotic in aquaculture. Fish Disease **25**, 1-10.

Jaramillo, J.F., Gatlin, D.M. 2004. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without β-glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. World Aquaculture Society **35**, 245-252.

Jeney, G., Galeotti, M. Volpatti, D. Jeney, Z., Anderson, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture. **154**, 1-15.

Jorgensen, J.B., Robertsen, B. 1995. Yeast β-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages. Developmental & Comparative Immunology **19**, 43-57.

Kim, Y.S., Ki, F., Zhang. Q.Y. 2009. Effect of β-glucan on activity of ntioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. Fish and Shellfish Immunology **27**, 336-340.

Mirsa, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., (2006). Efect of multiple injections of β-glucan on non-specifc immune response and disease resistance in (Labeo rohita) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology **20**, 305-319.

Mirsa, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. 2006. Efect of multiple injections of β-glucan on non-specifc immune response and disease resistance in (*Labeo rohita*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology **20**, 305-319.

Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. Fish Shellfish Immunology **9**, 269-290.

Russo, R., Mitchell, H., Roy, P., Yanong, E. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture **256**, 105-110.

Secombes, C. 1994. Macrophage activation in fish. SOS Publications Fair Haven, New Jersey USA, 49-57 p.

Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R. 1998_b. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunology **8**, 409-424.

Vetvicka, V., Yvin, J.C. 2004. Effects of marine β-1,3 glucan on immune reactions. International Immunopharmacology **4**, 721-730.

Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C. 2006. Cross effects of the strain of dietary Saccharomyces cerevisiae and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, (Onchorhynchus mykiss), fry. Aquaculture **258**, 470-478.

Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, (Onchorhynchus mykiss), fry. Aquaculture **258**, 470-478.

Wang, W., Wang, D. 1996. Use of glycans to increase resistance of bighead carp, (*Aristichthys nobilis*), and milkfish, Chanos chanos, to bacterial infections. Taiwan Veterinary Medicine Animal **66**, 83-91.

Whittington, R., Lim, C., Klesius., P.H. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia,(*Oreochromis niloticus*). Aquaculture **248**, 217-225.