مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۹ شماره ۴ پاییز ۱۳۹۹ صفحات ۲۵۶-۲۴۴

اثرات مصرف خوراکی سدیم دی فرمات و اسید سیتریک بر برخی شاخص‌های ایمنی مخاطی پوست قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت چالش با عامل یرسینیوزیس

نیما شیری[۱،۲*]، محمد جواد محمدی[۳،۴]

۱- بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲- سازمان شیلات ایران، اداره کل شیلات استان خوزستان، آبادان، ایران
۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۴- سازمان شیلات ایران، اداره کل شیلات استان سیستان و بلوچستان، چابهار، ایران

چکـــیده

پژوهش پیش رو با هدف بررسی اثرات مصرف خوراکی سدیم دی فرمات همراه با اسید سیتریک بر برخی شاخص‌های ایمنی مخاطی (پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل (TIg)، لایزوزیم، پروتئاز، استراز و آلکالین فسفاتاز (ALP)) پوست قزل‌آلای رنگین کمان تحت چالش با عامل یرسینیوزیس (*Yersinia ruckeri*) انجام شده است. پس از تعیین میانه دوز کشنده (LD50) ۷ روزه *Y. ruckeri*، ماهیان به طور تصادفی در قالب هشت تیمار و دو تکرار ذخیره‌سازی شدند. افزودن اسیدی کننده‌ها (Acidifiers) به صورت منفرد با دوز ۰/۲ درصد و توامان ۰/۱+۰/۱ درصد به خوراک تجاری بوده است. مدت زمان ۵ روز پس از تلقیح، خوراک دهی ماهیان با اسیدی فایرها آغاز شد و پس از گذشت ۱۵ روز، از موکوس پوست ماهیان بیهوش شده، نمونه برداشته شده و شاخص‌های ایمنی سنجیده شدند. نتایج پایلوت نشان داد که LD50 ۷ روزه *Y. ruckeri* برابر با $۸/۹۱\times۱۰^{۵}$ CFU/ml بوده است. در آزمایش اصلی، یافته‌ها حاکی از وجود اثر معنی‌دار سدیم دی فرمات بر افزایش سطح پروتئین کل و فعالیت پروتئازی مخاط ماهیان سالم و بیمار بود. جیره غذایی حاوی اسیدی فایرها با دارا بودن ظرفیت هم‌افزایی، سبب القای TIg مخاطی گردید. به نظر می‌رسد که مصرف دست کم ۱۵ روزه اسیدی فایر خوراکی سدیم دی فرمات در دوز ۰/۲ درصد جیره غذایی به تنهایی یا به صورت توام با اسید سیتریک (دوز ۰/۱+۰/۱ درصد) می‌تواند سبب بهبود بیشتر شاخص‌های ایمنی مخاطی پوست شود، که برآیند آن نیز افزایش درصد زنده مانی ماهیان قزل‌آلای پرورشی است.

کـــلید واژه ها: اسیدی کننده، ایمنی مخاطی، قزل‌آلای رنگین کمان، محرک ایمنی، *Yersinia ruckeri*

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۷
تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۳۹۹/۹/۲۸

***نویسنده مسول:**
nima.shiry@gmail.com

مقدمه

یکی از روش‌های در حال توسعه برای ارزیابی سلامت ماهی، سنجش شاخص‌های ایمنی مخاطی (موکوسی) است. مزیت نسبی این روش این است که در عین همترازی نتایج آن با شاخص‌های سرمی، نمونه برداری آسان‌تر و کم هزینه‌تری دارد و ماهیان نمونه برداری شده معمولا زنده و سالم باقی می‌مانند [۱ و ۲]. در وهله نخست، مخاط پوست به عنوان سد فیزیکی اولیه علیه عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند، پس از آن، پاسخ‌های ایمنی از طریق واکنش‌های شیمیایی به مبارزه با پاتوژن‌ها می‌پردازند [۳ و ۴]. مخاط پوست ماهی ترکیبی از آب و ملکول‌های حفاظتی گوناگونی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

مانند لایزوزیم، پروتئاز، استراز، آلکالین فسفاتاز (ALP) و ایمونوگلوبولین ام (IgM) است [۵]، که بر اساس مطالعات مختلف، نسبت این ترکیبات بسته نوع منشاء استرسی نظیر زیستی (پاتوژن) و شیمیایی (آلاینده) متفاوت می‌باشد [۴].

سدیم دی فرمات (NDF: Na diformate) ترکیبی است از اسید فرمیک (CHOOH) و فرمات سدیم (HCOONa) که به عنوان یک اسیدی کننده (Acidifier) شناخته می‌شود. بدین اعتبار که این گروه از ترکیبات آلی که واجد ۱ الی ۷ اتم کربن در ساختار شیمیایی خود هستند، توانایی اسیدی کردن دستگاه گوارشی مصرف کننده را دارند. این ترکیبات علاوه بر اینکه به عنوان محرک‌های رشد در ماهی شناخته می‌شوند، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا را افزایش می‌دهند [۶]. به طور ویژه، اثرات ضد باکتریایی بر پاتوژن‌های دستگاه گوارش نظیر سالمونلا با کاهش یافتگی pH گوارشی حاصل از مصرف یک اسیدی فایر نظیر سدیم دی فرمات دیده شد [۷]. اسیدی شدن دستگاه گوارش ماهی بر روی بهبود قابلیت هضم خوراک و افزایش راندمان تغذیه‌ای موثر بوده و کیفیت پروتئین مصرفی جیره را بهبود بخشیده است [۸]. در پژوهش پیشین که بر روی اثر ترکیبی سدیم دی فرمات (۰/۱ درصد) و اسید سیتریک (۰/۱ درصد) بر پارامترهای ایمنی سرمی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان صورت گرفت، نشان دادیم که این اسیدی فایر سبب افزایش قدرت باکتری کشی سرم، پروتئین کل و IgM شده است [۹].

باکتری *Yersinia ruckeri* عامل یرسینیوزیس یا بیماری دهان قرمز روده‌ای (Enteric redmouth disease)، یکی از مهمترین بیماری های عفونی در صنعت پرورش آزاد ماهیان است. با وجود اینکه نزدیک به چهار دهه است که در جهان شناسایی شده، در اوایل دهه ۸۰ خورشیدی بود که عامل عفونی آن توسط Soltani و همکاران [۱۰] از قزل‌آلای پرورشی در ایران جدا شد. این بیماری در روندهای حاد یا مزمن می‌تواند در مزارع پرورش ماهی ایجاد تلفات و زیان‌های سنگین اقتصادی نماید. عموما ایجاد همه‌گیری به شرایط تراکم پرواربندی و کیفیت آب وابسته است [۱۱ و ۱۲]. تلفات در سیستم‌های مداربسته بسیار شدیدتر از سیستم‌های جاری رخ می‌دهد [۱۱]. علائم درمانگاهی تیپیک در ماهیان شامل هموراژی در لب‌ها، دهان و حلق، همراه با سیاه شدگی پوست می‌باشد و در کالبدگشایی نیز هموراژی در ارگان‌های داخلی غالب نمونه‌ها مشهود است[۱۳].

با توجه به جایگاه اثر این عامل پاتوژن که بخش‌های میانی دستگاه گوارش ماهی است [۱۳]، بسیاری از پرورش دهندگان به تجربه دریافته‌اند که تغییر در اسیدیته جیره غذایی و افزودن برخی اسیدهای معدنی نظیر جوهر لیمو (اسید سیتریک) می‌توانند سبب بهبود وضعیت شده و از بروز عفونت پیشگیری نمایند و یا در صورت بروز بیماری کنترل بهتری بر روی ماهیان درگیر داشته باشند. بر همین اساس پیش‌تر در یک آزمایش استاندارد شده نشان داده شد که بکارگیری دوز ۸۰ گرم اسید سیتریک بر کیلوگرم خوراک به اندازه فلورفنیکل خوراکی (دست کم به مدت ۱۰ روز دوره درمانی)، می‌تواند در کاهش تلفات، مهار یرسینیوزیس تجربی و بهبود علائم عفونی درمانگاهی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان موثر باشد [۱۴]. با توجه به اثرات مثبت سدیم دی فرمات بر رشد، ضریب تبدیل غذایی و برخی شاخص‌های ایمنی [۹] و همینطور القای برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک سازشی نسبت به افزایش اسیدیته [۱۵]، پژوهش پیش رو در نظر دارد تا اثرات مصرف خوراکی این اسید آلی و همراه با اسید سیتریک بر برخی شاخص‌های ایمنی مخاطی پوست قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) تحت چالش با باکتری *Y. ruckeri* به عنوان عامل یرسینیوزیس بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

جانوران آزمایشی و شرایط نگهداری آن‌ها

بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین کمان (۰/۷ ± ۱۶/۵ گرم) از بخش خصوصی در استان فارس تهیه شده و به کارگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انتقال یافت. این ماهیان به منظور سازش‌پذیری (Acclimatization) در تانک‌های ونیرو با حجم ۵۰۰ لیتر دارای جریان آب تازه و هوادهی مداوم به مدت ۱ هفته نگهداری شدند. در طول این دوره این ماهیان با کنستانتره ایرانی (۲ بار در روز) و تا پیش از تقسیم شدن در گروه‌های آزمایشی تغذیه شدند. منبع آب تانک‌ها یک حلقه چاه با دبی ۳-۱ l/s، سختی کل ۲۲/۴ mg/l ± ۳۴۴/۵ و pH برابر با ۷/۸ بوده است. در طول آزمایش، روش شیمیایی مبتنی بر اکسیداسیون یون منگنز (متد وینکلر) به منظور پایش اکسیژن محلول

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

مورد استفاده قرار گرفت و این فراسنجه به طور متوسط برابر با ۰/۷ ± ۵/۴۱ mg/l بوده است. دمای آب (۰/۵ ± ۱۶/۵ C°) نیز با استفاده از دماسنج جیوه‌ای مورد پایش قرار گرفت. تعویض آب روزانه به میزان حداکثر ۲۰ درصد حجم هر تانک و هوادهی از طریق یک سیستم مرکزی انجام می‌شد.

آماده‌سازی و تلقیح باکتری

نمونه باکتریایی *Y. ruckeri* از ایزوله‌های موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (جدا شده از ماهیان پرورشی بیمار استان فارس) بوده که پیش‌تر از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد تائید قرار گرفته بود [۱۱]. این جدایه‌ها روی محیط های Brain heart infusion agar (BHIA) و Nutrient agar کشت شدند و پس از انکوباسیون به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شدند [۱۶]. ابتدا باکتری‌های مورد نظر در محیط BHIA به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس باکتری‌های رقیق شده در محلول PBS استریل، از طریق لام نئوبار (هموسایتومتر) زیر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی عدسی ×۴۰) شمرده شدند و رقت‌های متوالی از 10^{2} CFU/ml الی 10^{9} تهیه گردید [۱۷]. تلقیح ماهیان از طریق تزریق صفاقی (IP) به حجم ۲۰۰ µl PBS استریل (برای هر فرد) و بعد از اعمال بیهوشی با استفاده از تریکائین متان سولفونات (MS-222) با غلظت حدود ۳۰ mg/l انجام شد. در طی دوره آزمایش پایلوت میزان تلفات ماهیان در ۷ روز متوالی ثبت شدند. دوزهای تزریقی مناسب برای مدت زمان آزمایش اصلی، بر اساس ۳۰ درصد مقدار میانه دوز کشنده (LD50) پاتوژن به کار گرفته شدند [۱۸].

طرح آزمایشی

بعد از طی شدن مرحله سازش‌پذیری، ماهیان ۱۲ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و سپس به طور تصادفی در بین تانک‌ها (۱۶ تانک) در قالب هشت تیمار مختلف در دو تکرار، هر تکرار ۱۰ قطعه بچه ماهی تقسیم شدند، که تیمارها به ترتیب جدول ۱ مشخص شدند.

جدول ۱- تشریح گروه‌های آزمایشی به‌کار گرفته شده در پژوهش

کد گروه	چالش عفونی	سدیم دی فرمات	اسید سیتریک	شرح
C-/NDF-/CA-	–	–	–	کنترل منفی
C-/NDF-/CA+	–	–	+	اثر منفرد اسید سیتریک (۰/۲ درصد)
C-/NDF+/CA-	–	+	–	اثر منفرد سدیم دی فرمات (۰/۲ درصد)
C-/NDF+/CA+	–	+	+	اثر توامان اسیدی فایرها (۰/۱ + ۰/۱ درصد)
C+/NDF-/CA-	+	–	–	کنترل مثبت
C+/NDF-/CA+	+	–	+	اثر منفرد اسید سیتریک (۰/۲ درصد)
C+/NDF+/CA-	+	+	–	اثر منفرد سدیم دی فرمات (۰/۲ درصد)
C+/NDF+/CA+	+	+	+	اثر توامان اسیدی فایرها (۰/۱ + ۰/۱ درصد)
C = چالش عفونی؛ NDF = سدیم دی فرمات؛ CA = اسید سیتریک				

به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، از خوراک تجاری اکسترود FFT2 (ترکیبات شامل: پودر ماهی آنچووی ۴۶ درصد، آرد گندم ۲۰ درصد، روغن ماهی ۱۲ درصد، پودر پر و استخوان ۷ درصد، آرد سویا ۶ درصد، پودر خون ۳ درصد، پودر گلوتن ذرت ۲ درصد، میکس ویتامین ۱/۵ درصد و میکس مواد معدنی ۰/۵ درصد) شرکت قیدرپاتیرا (شهرکرد) استفاده شد. اسیدی فایرهای مورد نیاز شامل سدیم دی فرمات و اسید سیتری ($C_6H_8O_7$) از گروه صنعتی مهدامین (تهران) خریداری و به آزمایشگاه کارخانه تولید خوراک انتقال داده شدند. در آنجا نیز بدون تغییر فرمولاسیون به مواد خشک جیره افزوده شده و پس از مخلوط کردن مواد اولیه وارد خط تولید کارخانه شدند. برای تیمارهای کنترل از غذای تجاری بدون اسیدی فایر استفاده شد. در طول آزمایش اصلی، تلفات روزانه ماهیان همراه با علائم درمانگاهی ثبت شدند، تا نرخ بقا محاسبه شود.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

نمونه برداری

مدت زمان ۵ روز پس از عفونی سازی با *Y. ruckeri* مطابق با زمانی که علائم درمانگاهی مشخصی در بیشتر ماهیان ظهور کرد، خوراک دهی ماهیان با اسیدی فایرها آغاز شد. پس از گذشت ۱۵ روز دیگر، از موکوس پوست ماهیان آزمایشی نمونه برداشته شد. بدین ترتیب ابتدا برای ۲۴ ساعت خوراک دهی قطع شد تا استرس ناشی از دستکاری ماهیان کاهش یابد. سپس آنها به صورت عمیق با دوز بیش از ۲۰۰ قسمت در میلیون MS222 بیهوش شدند. مخاط پوستی با روش تشریح شده توسط Ross و همکاران [۱۹]، و Esteban و Cerezuela [۲۰] برداشت شد. بر این اساس ماهیان جداگانه در کیسه‌های پلی اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی لیتر سدیم کلراید (۵۰ mM) به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند. برخورد مکانیکی با سطوح کیسه سبب تحریک ترشح مخاط پوستی در ماهی می‌گردد. نمونه‌های برداشت شده فورا به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰ g دمای ۴ °C) شدند و رونشین حاصل در دمای ۸۰- °C تا زمان آغاز تست‌ها نگهداری گردید. تمامی فرایندهای مرتبط با ماهیان مورد مطالعه از آئین نامه اخلاق زیستی دانشگاه شیراز برای نگهداری و بکارگیری جانوران مهره‌دار در مطالعات آزمایشگاهی (IACUC. No. 4687/63) پیروی کرده است.

سنجش شاخص‌های ایمنی مخاطی

شاخص‌های ایمنی مخاطی اندازه‌گیری شده شامل سطوح پروتئین کل (TP)، ایمونوگلوبولین کل (TIg)، فعالیت آنزیم‌های لایزوزیم، پروتئاز، استراز و آلکالین فسفاتاز (ALP) بودند. تیتر TIg مخاطی بر اساس روش پیشنهادی Siwicki و Anderson [۲۱] مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، نخست TP به وسیله روش Lowry [۲۲] سنجیده شد و مجددا پس از افزودن گلایکول پلی اتیلن (۱۲ درصد)، ۲ ساعت خوابانیدن و سانتریفیوژ (۳۰۰۰ g در دمای اتاق) به مدت ۱۵ دقیقه دوباره TP اندازه گرفته شد. تفاضل دو عدد حاصل شده در واقع نشانگر مقدار ملکول‌های Ig است.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم مخاط، از کدورت سنجی Nayak و همکاران [۲۳] بر پایه تجزیه باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC4698) لیوفلایز شده و روش الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. بدین منظور، ابتدا محلول ۰/۰۵ مولار بافر فسفات سدیم (pH = ۶/۲) آماده شده و مقدار ۱۰ µl از سرم به ۲۰۰ µl از سوسپانسیون باکتری (رقت ۰/۲ µg/ml) افزوده شد. ترکیبات فوق در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای مخلوط شدند و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج مناسب خوانده شد (بلانک: محلول PBS). جذب نوری نمونه‌ها پس از ۱ ساعت خوابانیدن محلول در دمای ۲۴ °C مجددا اندازه‌گیری شد. سرانجام، فعالیت آنزیم به صورت مقادیری که سبب کاهش جذب به میزان ۰/۰۰۱ OD/min/ml گردد، محاسبه شده است و غلظت‌های لایزوزیم با استفاده از منحنی‌های استاندارد غلظت‌های لایزوزیم سفیده تخم مرغ (Sigma-Aldrich, USA) مقایسه گردید.

فعالیت پروتئازی از طریق هیدرولیز سوبسترای آزوکازئین مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین شرح که میزان مشخصی از نمونه موکوسی (۵۰ µl) به محلولی متشکل از بی کربنات آمونیوم (۱۰۰ µl ؛ pH = ۷/۸) و آزوکازئین (۵۰ µl) افزوده شده و این فرآورده به مدت۲۰ ساعت در دمای ۳۰ °C انکوبه گردید. همزمان با اضافه شدن ۵۰ µl تری کلرواستیک اسید (۲۰ درصد)، واکنش‌های شیمیایی متوقف شده و محلول حاصل در ۱۵۴۰۰ g برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در پایان، ۱۰۰ µl از رونشین با سود ۰/۵ مولار مخلوط شده و جذب نوری آن در طیف ۴۰۵ نانومتر خوانده شد [۲۴].

اندازه گیری فعالیت استرازی بر مبنای روش پیشنهادی Ross و همکاران [۱۹] صورت گرفت. طی این فرایند ۴- نیتروفنول مریستات (Sigma-Aldrich, USA) به عنوان سوبسترا و محلول فست بلو (غلظت ۰/۵ mg در ۱ ml بافر فسفات) به عنوان معرف رنگی بکار گرفته شدند و فعالیت آنزیمی توسط میکروپلیت ریدر (Bio Tek ELx 808, USA) در طیف ۴۰۵ نانومتر سنجیده شد. همچنین برای سنجش فعالیت ALP، روش بسی- لوری- بروک (مورد تائید انجمن بیوشیمی آلمان) با تبدیل واسطه آنزیمی پی- نیتروفنول فسفات به نیتروفنول در آلکالین بافر بکار

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

گرفته شد [۱۸]. واکنش اشاره شده با استفاده از کیت بیوشیمیایی تجاری پارس آزمون محتوی معرف‌های دیتانولامین (۹/۸ = pH؛ ۱ mol/l)، منیزیوم کلراید (۰/۵ mmol/l) و پی- نیتروفنول فسفات (۱۰ mmol/l) و جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر هیتاچی (UV/VIS 704, Japan) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد پایش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

مقادیر دوزهای کشنده (LD90, LD50, LD10) بر اساس معادله Reed و Muench محاسبه شدند [۲۵]. آزمون اماری کولموگروف-اسمیرنوف به جهت تائید نرمال بودن و همگنی داده‌های مربوط به شاخص‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. سپس گروه‌های آزمایشی از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (P-value =۰/۰۵) و آزمون تعقیبی دانکن با یکدیگر مقایسه شدند. همگی تحلیل‌های آماری بوسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شدند.

نتایج

میانه دوز کشنده

نتایج آزمایش میانه دوز کشنده نشان داد که با افزایش دوز پاتوژن، میزان مرگ و میر به شکل نمایی افزایش می‌یابد. بر اساس میزان مرگ و میرهای ثبت شده در پایلوت، مقادیر (LD90, LD50, LD10) در دوره زمانی ۷ روزه (۱۶۸ ساعت) در جدول ۲ مندرج هستند.

جدول ۲: دوزهای کشنده *Y. ruckeri* در قزل‌آلای رنگین کمان

زمان ثبت مرگ و میر	دوز کشنده		
	LD10 (CFU/ml)	LD50 (CFU/ml)	LD90 (CFU/ml)
۲۴ ساعت	۳/۴۱×۱۰^{۷}	۸/۴۱×۱۰^{۱۸}	۲/۳۲×۱۰^{۳۴}
۴۸ ساعت	۱/۴×۱۰^{۷}	۶/۹۲×۱۰^{۱۱}	۱/۰۷×۱۰^{۲۳}
۷۲ ساعت	۹/۷۴×۱۰^{۵}	۱/۷۴×۱۰^{۹}	۳/۱۶×۱۰^{۱۹}
۹۶ ساعت	۵/۱۸×۱۰^{۵}	۱/۶۹×۱۰^{۸}	۸/۱۳×۱۰^{۱۴}
۱۲۰ ساعت	۳/۶۵×۱۰^{۴}	۳/۵۷×۱۰^{۷}	۹/۵۷×۱۰^{۱۱}
۱۴۴ ساعت	۷/۱۳×۱۰^{۳}	۵/۹۷×۱۰^{۶}	۵/۷۳×۱۰^{۹}
۱۶۸ ساعت	۲/۴۶×۱۰^{۳}	۸/۹۱×۱۰^{۵}	۷/۱۳×۱۰^{۸}

یافته‌های حاصل از پایلوت نشان داد که LD50 ۷ روزه *Y. ruckeri* برابر با CFU/ml ۸/۹۱×۱۰۵ بوده است. در ماهیان تلقیح شده با این باکتری، شروع علائم درمانگاهی عموما در روز پنجم رخ داده و علاوه بر سیاه شدگی جزئی در برخی ماهیان، علائمی نظیر هموراژی و زخم در مخرج، فک زیرین و همین‌طور خون‌ریزی سرسوزنی (Petechia) در اطراف باله‌های سینه‌ای و شکمی دیده شد (شکل ۱، A و B). بررسی بالینی لاشه نشان داد که خون‌ریزی سرسوزنی روی پیلوریک سکا، پرخونی در کبد و تجمع مخاط زردرنگ در لوله گوارشی ماهیان تلف شده وجود داشته است (شکل ۱، C).

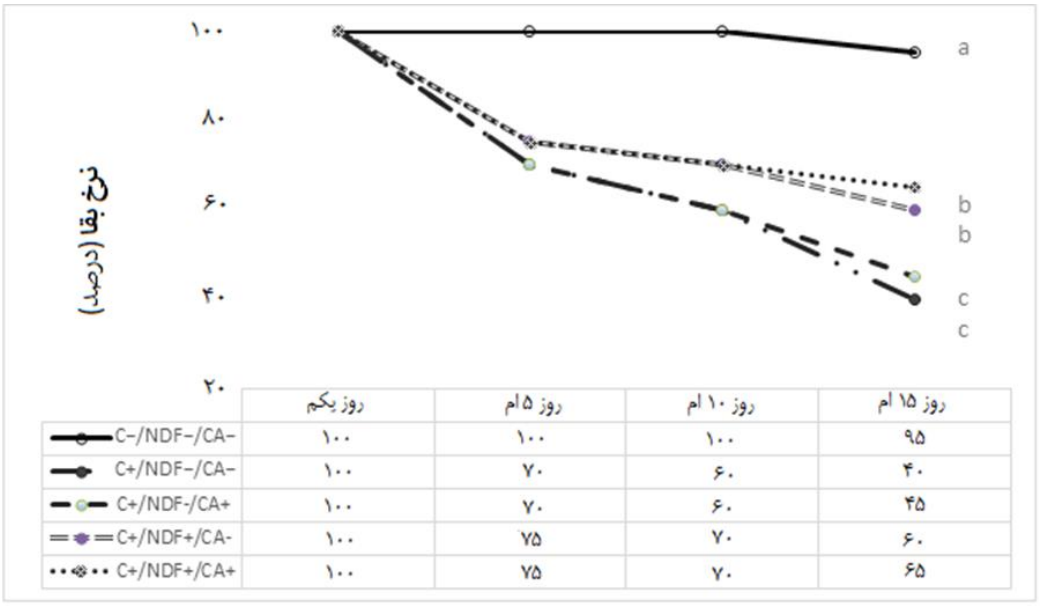
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

شکل ۱- یافته‌های معاینه درمانگاهی و کالبدگشایی ماهیان تلقیح شده با *Y. ruckeri* ؛ تصویر (A) هموراژی و زخم در مخرج و فک زیرین، (B) سیاه شدگی جزئی و خونریزی سرسوزنی اطراف باله سینه‌ای، (C) خون‌ریزی سرسوزنی روی پیلوریک سکا

نرخ بقا

نمودار ۱ نرخ بقای ماهیان در گروه‌های آزمایشی مختلف را که تحت چالش عفونی با *Y. ruckeri* بودند، نشان می‌دهد. به طور میانگین، ۶۰ درصد ماهیان تلقیح شده بدون دریافت هرگونه اسیدی فایر (C+/NDF-/CA-) ۱۵ روز پس از عفونی سازی تلف شدند. از سوی دیگر، بکارگیری توامان سدیم دی فرمات و اسید سیتریک (C+/NDF+/CA+) و سدیم دی فرمات به تنهایی (C+/NDF+/CA-) توانست نرخ بقا را نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری افزایش دهد ($p<۰/۰۵$). ولی اسید سیتریک به تنهایی (C+/NDF-/CA+) فاقد تفاوت آماری با گروه کنترل بوده است ($p>۰/۰۵$).



	روز یکم	روز ۵ ام	روز ۱۰ ام	روز ۱۵ ام
C-/NDF-/CA-	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۵
C+/NDF-/CA-	۱۰۰	۷۰	۶۰	۴۰
C+/NDF-/CA+	۱۰۰	۷۰	۶۰	۴۵
C+/NDF+/CA-	۱۰۰	۷۵	۷۰	۶۰
C+/NDF+/CA+	۱۰۰	۷۵	۷۰	۶۵

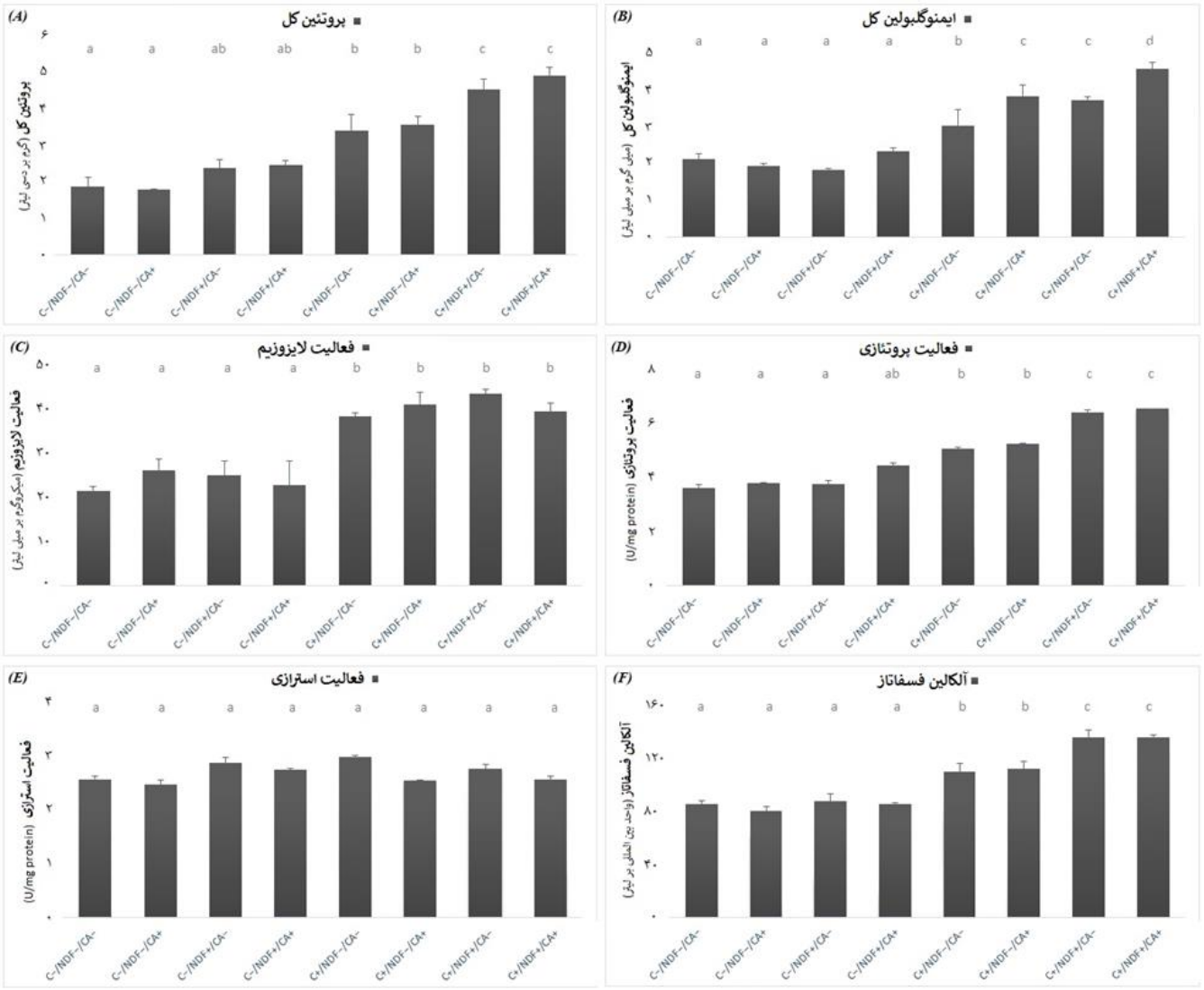
نمودار ۱- مقایسه اثرات سدیم دی فرمات و اسید سیتریک بر نرخ بقای قزل‌آلای تلقیح شده با عامل یرسینیوزیس (حروف مختلف (a, b, c,...) نشان دهنده تفاوت آماری در بین گروه‌های آزمایشی هستند ($p<۰/۰۵$))

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

شاخص‌های ایمنی مخاطی

تغییرات شاخص‌های ایمنی شامل پروتئین کل، TIg، و فعالیت لایزوزیم، پروتئاز، استراز و ALP در مخاط قزل‌آلای رنگین کمان سالم و بیمار شده با عامل یرسینیوزیس ناشی از تیمار با اسیدی فایرها (سدیم دی فرمات و اسید سیتریک) در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲- شاخص‌های ایمنی مخاطی تیمار شده با اسیدی فایرها (سدیم دی فرمات و اسید سیتریک) و چالش با *Y. ruckeri*
(حروف مختلف (a, b, c,...) نشان دهنده تفاوت آماری در بین گروه‌های آزمایشی هستند (p<۰/۰۵))

نتایج حاکی از وجود اثر معنی‌دار سدیم دی فرمات بر افزایش سطح پروتئین کل و فعالیت پروتئازی مخاط ماهیان سالم و بیمار بوده است (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲، A و D). با وجود اینکه اثر توامان اسیدی فایرها بر این شاخص‌های عمومی دیده شد (p<۰/۰۵)، هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروهی که اسید سیتریک دریافت کردند با گروه کنترل مشاهده نگردید (p>۰/۰۵؛ نمودار ۲A). به استناد این یافته‌ها، جیره غذایی حاوی سدیم دی فرمات و اسید سیتریک با دارا بودن ظرفیت هم‌افزایی، سبب القای TIg مخاطی گردید (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲، B). در حالی که هر دو اسیدی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

فایر به صورت منفرد نسبت به گروه شاهد توانایی افزایش تراز این شاخص را داشته‌اند (p<۰/۰۵)، ولی هیچ تفاوت معنی‌داری میان آنها وجود نداشت (p>۰/۰۵).

تنها عامل موثر بر تغییر فعالیت لایزوزیم بین گروه‌های آزمایشی، عفونی سازی تجربی با پاتوژن بوده است (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲، C)، که حتی این عامل نیز نتوانست تغییر معنی‌داری در فعالیت استرازی تیمارها ایجاد نماید (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲، E). سطوح ALP مخاطی تحت تاثیر مصرف جیره حاوی سدیم دی فرمات و هر دو اسیدی فایر (توام)، تنها در ماهیان تحت چالش با باکتری به طور معنی داری افزایش یافتند (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲، F)، ولی در ماهیان سالم تغییر چشمگیری از این نظر دیده نشد (p>۰/۰۵).

بحث

همانطور که پیش‌تر گفته شد، بکارگیری اسیدهای آلی به عنوان اسیدی فایر دستگاه گوارش و افزایش دهنده کارایی تغذیه‌ای در ماهیان و در نتیجه رشد بیشتر آنها و کاهش ضریب تبدیل غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است [۸]. از دیگر سو، برانگیختن شاخص‌های گوناگون دستگاه ایمنی در جهت بهبود وضعیت هموستازی و افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا، از دیگر نقش‌های این ترکیبات شیمیایی است [۷ و ۹]. این عملکرد دوگانه اسیدهای آلی، اعتبار بالایی به آنها به عنوان افزودنی به جیره غذایی ماهیان داده است. در گذشته، اسیدهای آلی به دلیل تولید نمک در واکنش شیمیایی، تنها به عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی کاربرد داشتند ولی این رویکرد با توجه به مطالعات اخیر در حوزه تغذیه ماهیان تغییر کرد. امروزه، ویژگی تحریک دستگاه ایمنی ماهیان بیش از پیش مورد توجه است [۲۶]. از این رو تحقیق حاضر، با هدف بررسی اثرات مصرف خوراکی سدیم دی فرمات و همراه با اسید سیتریک بر برخی شاخص‌های ایمنی مخاطی پوست قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) تحت چالش با *Y. ruckeri* انجام شد. نتایج نشان داد که عفونی سازی تجربی با این پاتوژن سبب ایجاد بیماری یرسینیوزیس با علائم تیپیک در ماهیان آزمایشی گردید. میانه دوز کشنده ۷ روزه باکتری برای ماهی قزل‌آلا برابر با ۸/۹۱×۱۰۵ CFU/ml نشان دهنده قدرت بالای پاتوژنزیس و روند نسبتا حاد آن است. از نظر درمانگاهی، بکارگیری تیمارهای سدیم دی فرمات منفرد و توامان با اسید سیتریک علاوه بر افزایش نرخ بقای ماهیان در پی تلقیح پاتوژن، سبب بهبود علائم درمانگاهی به ویژه خون‌ریزی و ضایعات در اطراف فک زیرین و مخرج ماهیان شده است. این یافته‌ها، با توصیف روند درمان یرسینیوزیس توسط Guijarro و همکاران [۲۷] سازگار است. اگرچه در پژوهشی دیگر نشان دادیم که اسید سیتریک توانایی بهبود علائم کلینیکی و افزایش زنده‌مانی در ماهیان تحت چالش با *Y. ruckeri* را دارد. تفاوت با نتایج تحقیق پیش رو را می توان در اختلاف دوزاژ درمانی آن جستجو نمود. به طوری که برای مهار یرسینیوزیس حدقل دوز ۸۰ گرم اسید سیتریک خوراکی بر کیلوگرم خوراک (معادل ۸ درصد) برای دوره ۱۰ روزه لازم است؛ LD50 محاسبه شده نیز برابر با ۶۸/۳۳ گرم بر کیلوگرم بوده تا این اسید معدنی بتواند زنده‌مانی دست کم نیمی از جمعیت ماهیان بیمار را تامین نماید [۱۴]. دوز اشاره شده با کاهش دادن pH گوارشی، پاسخ‌های ایمنی ذاتی را به عنوان سازش فیزیولوژیک در مقابل عفونت‌های روده‌ای (مانند یرسینیوزیس) تحریک نموده و مقاومت بدن ماهی را افزایش می‌دهند [۲۷]. هر نوع استرس‌زای زیستی یا شیمیایی می‌تواند ترکیب مخاط پوستی را تغییر داده تا این عملکرد سازشی سبب بهبود نقش سد دفاعی آن گردد [۳]. شرایط عفونی به طور طبیعی سطح پروتئین کل مخاطی را افزایش می‌دهد زیرا واحدهای حفاظتی (پروتئین‌های آنزیمی یا ایمونوگلوبولین‌ها) بیشتری ترشح می شود [۲۰]. نتایج ما نشان داد که سدیم دی فرمات به عنوان یک محرک ایمنی سبب القای ترشح پروتئین کل مخاط شده است. این نتایج با یافته های پیشین در ارتباط با پروتئین کل سرم مطابقت تام دارد [۹]. با توجه به اینکه اسیدهای آلی به طور مستقیم بر سلول‌های اپی تلیال روده‌ای اثرگذار هستند، سبب تحریک آنها به ترشح مخاط بیشتر می‌شوند و از منظر شیمیایی در این مخاط نیز ترشح پیام‌رسان‌های ایمنی نظیر سایتوکاین ها که متشکل از پروتئین‌ها هستند را در پی دارند [۲۸]. به استناد این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که علاوه بر مخاط روده‌ای این اثر القایی روی مخاط پوستی ماهیان نیز وجود دارد. اگرچه با بررسی سایر شاخص‌های هومورال نظر دقیق‌تری می‌توان ابراز کرد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

یکی از مهمترین پروتئین‌های موجود در مخاط، ایمونوگلوبولین‌ها هستند که در ماهیان علاوه بر ایفای نقش اصلی در ایمنی اکتسابی، به عنوان عوامل طبیعی ایمنی هومورال ذاتی نیز در دفاع از بدن ماهی نقش دارند [۲۹]. نتایج پیش رو حکایت از این دارند که سدیم دی فرمات و اسید سیتریک هر دو چه به صورت منفرد و چه به صورت توامان سبب القای TIg شدند. در مورد این آنتی بادی‌های طبیعی که توسط بلاست سل‌ها تولید می‌شوند [۴]، می‌توان اظهار داشت که مصرف خوراکی اسیدی فایرهای آلی یا معدنی سبب افزایش حساسیت یاخته‌های تولیدکننده ملکول های ایمونوگلوبولین به پاتوژن‌ها خواهند شد. کما اینکه تفاوت‌های معنی‌دار تنها بین گروه‌هایی دیده شد که به طور تجربی به یرسینیوزیس مبتلا شده بودند. از سوی دیگر، ارتقای سطح این پروتئین‌های حفاظتی در شرایط عفونی نشان‌دهنده افزایش میانجی‌های التهاب و سایتوکاین‌های مترشحه از آن‌ها است [۱۸]. این یافته‌ها با نتایج Mohammadi و همکاران [۹] که اثرات این اسیدی فایرها را بر شاخص‌های ایمنی سرمی و سلول‌های خونی قزل‌آلا، و Omosowon و همکاران [۹] که اثرات اسید فرمیک را بر شاخص‌های خونی گربه ماهی آفریقایی مورد مطالعه قرار دادند، مطابقت چشمگیری دارد. از دیگر آنزیم‌های دفاعی اصلی در مخاط ماهیان پروتئازها هستند که علی‌رغم تفاوت‌های آشکار در ساختمان شیمیایی، بر اساس عملکردشان که بر تجزیه پروتئین‌ها به ویژه در دیواره و غشای سلولی عوامل پاتوژن استوار است، در یک رده قرار داده می شوند [۱]. مکانیسم فعالیت این گروه از آنزیم‌ها مستقیما از راه شکستن پروتئین دیواره باکتری‌ها، یا به طور غیرمستقیم از طریق فعال‌سازی سایر اجزای دستگاه ایمنی ذاتی نظیر ایمونوگلوبولین‌ها یا مسیرهای سامانه کمپلمان است [۳۱]. یافته‌ها از این حکایت دارند که سدیم دی فرمات توانسته در طول دوره آزمایش، فعالیت پروتئازی در مخاط را القا نماید. در پژوهشی که سابقا بر روی شاخص‌های سرمی انجام شد، گرچه فعالیت پروتئاز مشخصا مورد سنجش قرار نگرفته بود، ولی به صورت عمومی، این اسید آلی توانست قدرت باکتری کشی سرم را بهبود بخشد [۹]، بنابراین سازگاری نسبتا زیادی با یافته‌های کنونی داشت. به طور مشابهی محرک‌های ایمنی نامداری مانند ارگوسان [۳۲] و مخمر آبجو [۳۳] افزایش‌دهنده فعالیت پروتئاز مخاطی هستند. از این نظر، اسیدی فایر اشاره شده را می‌توان یک محرک ایمنی به شمار آورد. همانطور که پیش‌تر بیان شد، فعالیت لایزوزیم مخاط از مصرف خوراکی جیره درمانی با سدیم دی فرمات و اسید سیتریک اثر نپذیرفت و تنها عامل تغییردهنده چالش با *Y. ruckeri* بود. جالب است که لایزوزیم سرمی نیز در مواجهه با این ترکیبات افزودنی به جیره، تغییری در سطح فعالیت خود نشان نداد [۹]. این شاخص ایمنی ذاتی به دلیل توانایی بالا در تجزیه پپتیدوگلایکن باکتری‌ها، به احتمال زیاد موثرترین پروتئین باکتریولیتیک شناخته شده است [۳]. گزارش های علمی نشان می‌دهند که نوتروفیل‌های رسیده به مکان التهاب که منشا خونی دارند، عامل اصلی ترشح لایزوزیم هستند. این یاخته‌های ایمنی در هر شرایطی نقش خط مقدم دفاع را در واکنش‌های التهابی بدن ایفا می‌کنند. در نتیجه، عفونت با پاتوژن باکتریایی شرایطی را برای شکوفایی نوتروفیل‌ها و سایر میانجی‌های التهاب فراهم می‌کند [۳۴ و ۳۵] که این می‌تواند با افزایش فعالیت لایزوزیم مرتبط باشد. فعالیت آلکالین فسفاتاز مخاطی نیز متاثر از مصرف جیره حاوی سدیم دی فرمات و هر دو اسیدی فایر (توام) در ماهیان تحت چالش با باکتری بوده است. عموما این شاخص آنزیمی برای تشخیص آسیب‌های کبدی ناشی از استرس‌زاهای شیمیایی کاربرد دارد [۳]. بنابراین، ترشح ALP در سرم یا مخاط می توانست ناشی از مصرف نامتناسب اسیدی فایرها نسبت به وزن ماهی باشد [۲۹]، که با توجه به اینکه در نتایج ما تنها در گروه تحت چالش عفونی افزایش سطح دیده می‌شود، این نتیجه‌گیری نمی‌تواند صحیح و واقع بینانه باشد. به عبارت دیگر، شرایط عفونی بستری را مهیا کرده است تا ترکیبات مورد مطالعه به القا و فعال‌سازی این آنزیم با کارکرد حفاظتی منجر شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که مصرف اسیدی فایر خوراکی سدیم دی فرمات در دوز ۰/۲ درصد جیره غذایی به تنهایی یا به صورت توام با اسید سیتریک (دوز ۰/۱+۰/۱ درصد)، دست کم به مدت ۱۵ روز، می‌تواند سبب بهبود بیشتر شاخص‌های ایمنی مخاطی پوست و احتمالا روده (به عنوان یک واحد اپی تلیال) شود، که برآیند آن افزایش درصد زنده مانی ماهیان قزل‌آلای پرورشی است. پیش از بکارگیری این یافته‌ها در مزرعه، پیشنهاد می‌شود تحقیقات تکمیلی در این خصوص صورت گیرد. برای نمونه بهتر است که فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهیان تحت چالش با عامل یرسینیوزیس پس از تیمار با اسیدی فایرها مورد بررسی قرار گیرد. همچنین برداشت نمونه و کشت این باکتری در تیمارهای خوراکی موثر توصیه

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

میشود. از این گذشته، ارزیابی کارایی برون‌تنی (In vitro) این ترکیبات شـیمیایی مهار رشد یا کشندگی نسبت به پاتوژن اشاره شده ضروری است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر سیاوش سلطانیان، رضا سلیقه زاده و محمد سعید فریدونی (بهش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز)، همچنین دکتر اسماعیل کاظمی و مهندس جواد مهدوی (مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج) به خاطر همکاری سودمندشان، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Esteban MÁ. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin, ISRN Immunology 2012: 1-29.

2- Caipang CMA, Lazado CC. 2015. Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants,pre- and probiotics, in: B.H.B. Peatman (Ed.), Mucosal Health in Aquaculture, Academic Press, San Diego, 2015, pp. 211-272.

3- Soltanian S, Hoseinifar SH, Gholamhosseini A. 2018. Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cutaneous mucosal immune responses following anesthesia: a comparative study on different anesthetic agents, Fish & Shellfish Immunology 80: 319-324. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.032

4- Tacchi L, Lowrey L, Musharrafieh R, Crossey K, Larragoite ET, Salinas I. 2015. Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture 435: 120-27.

5- Guardiola FA, Cuesta A, Arizcun M, Meseguer J, Esteban MA. 2014. Comparative skin mucus and serum humoral defense mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*), Fish & Shellfish Immunology 36: 545-51.

6- Wing-Keong N, Chik-Boon K. 2016. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals, Reviews in Aquaculture 1–27. https://doi.org/10.1111/raq.12141

7- Luckstadt C, Theobald P. 2009. Effect of a formic acid-sodium formate premixture on Salmonella, Campylobacter and further gut microbiota in broilers, Proceedings and tilapia (♀ *O. niloticus* x ♂ *O. aureus*) fingerlings, Egyptian Journal of Animal Production 52(1):81-88.

8- Morken T, Kraugerud OF, Barrows FT, Sorensen M, Storebakke T. and Overland M. 2011. Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 317: 138–145. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04. 020

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

9- Mohammadi MJ, Rajabzadeh Ghatrami E, Soltani M, Ghaedi A, Alishahi M. 2019. Effects of sodium diformate and citric acide on growth performance, immune and hematological parameters of the juvenile *Oncorhynchus mykiss*, Iranian Scientific Fisheries Journal 29(1): 117-129. [In Persian]
10- Soltani M, Fadaiifard F, Mehrabi MR. 1999. First report of a yersiniosis-like infection in farmed rainbow trout, Bulletin of European Association of Fish Pathologists 19: 173-176.
11- Akhlaghi M., Sharifi Yazdi H. 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran, Iranian Journal of Veterinary Research (Shiraz University) 9(25): 347-352.
12- Soltani M, Tarahomi M. 2002. Experimental infection of *Yersinia ruckeri* like bacterium isolated from rainbow trout farms in Tehran province. Third convention of Iranian Veterinary Clinicians. Mashhad, Iran. 29-31 October, P: 37. [In Persian]
13- Horne MT, Barnes AC. 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo, PTK and Bruno, DW (Eds.), Fish diseases and disorders-viral, bacterial and fungal infections (Vol. 3), CABI Publishing. PP: 455-477.
14- Shiry N, Gholamhosseini A, Soltanian S, Fereidouni MS. 2019. Proposed diet for preventing and control of Yersiniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The 7th Iranian Conference of Ichthyology, 30-31 October 2019, Khorramabad, Iran. [In Persian]
15- Vadyvaloo V, Viall AK, Jarrett CO, Hinz AK, Sturdevant DE, Hinnebusch BJ. 2015. Role of the PhoP–PhoQ gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract, Microbiology 161: 1198-1210.
16- Ruparelia J, Chatterjee A, Duttagupta S, Mukherji S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, Journal of Acta Biomaterialia 4: 707–716.
17- Alishahi M, Soltani M, Zargar A. 2009. Bacteriological study of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) mortality in Khuzestan province., Iranian Veterinary Journal 5(1): 25-34. [In Persian]
18- Shiry N, Soltanian S, Shomali T, Paknejad H, Hoseinifar H. 2019. Immunomodulatory effects of orally administrated florfenicol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following experimental challenge with streptococcosis/lactococcosis, International Immunopharmacology 73: 236-245. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.007
19- Ross NW, Firth KJ, Wang A, Burka JF, Jojnson SC. 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 Organisms 41: 43-51.
20- Esteban MA, Cerezuela R. 2015. Fish mucosal immunity: skin. In: Mucosal Health in Aquaculture. Beck, B., Peatman, E. (1st ed.), Elsevier Publishers. 76-112. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00004-2
21- Siwicki AK, Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanism assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum, Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods, Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, 1993, pp. 105–112.
22- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry 193: 265–275. PMID: 14907713
23- Nayak SK, Swain P, Nanda PK, Dash S, Shukla S, Meher PK, Maiti NK. 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*, Fish & Shellfish Immunology 24: 394–399. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.09.005

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

24- Coêlho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. 2016. Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: reexamining a traditional method using bromelain samples, BioMed Research International 2016: Special Issue, 6 pages. Article ID 8409183. https://doi.org/10.1155/2016/8409183
25- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints, American Journal of Epidemiology 27: 493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje. a118408
26- Luckstadt C. 2008. Effect of dietary potassium diformate on the growth and digestibility of Atlantic salmon *Salmo salar*, Proceedings of the thirteenth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, June 1–5, Florianopolis, Brazil. pp. 179.
27- Guijarro JA, Garcia-Torrico AI, Cascales D, Mendez J. 2018. The Infection Process of *Yersinia ruckeri*: Reviewing the Pieces of the Jigsaw Puzzle, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 8: 218.
28- Dibner JJ, Buttin P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism, Journal of Applied Poultry Research 11: 453-463.
29- Ezzatrahimi N, Soltanian S, Akhlaghi M, Hoseinifar SH. 2019. Effects of florfenicol on skin mucus immune parameters and immune related genes expression in zebrafish (*Danio rerio*), International Journal of Aquatic Biology 7(4): 211-217. https://doi.org/10.22034/ijab.v7i4.631
30- Omosowone O, Adekunle Dada A, Eunice A. 2014. Effects of dietary supplementation of fumaric acid on growth performance of African catfish *Clarias gariepinus* and *Aeromonas sobria* challenge, Croatian Journal of Fisheries 73: 13-19. http://dx.doi.org/10.14798/73.1.782
31- Zou HK, Hoseinifar SH, Miandare HK, Hajimoradloo A. 2016. *Agaricus bisporus* powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated intestinal cytokines gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings, Fish & Shellfish Immunology 58: 380-386.
32- Sheikhzadeh N, Karimi Pashaki A, Nofouzi K, Heidarieh M, Tayefi Nasrabadi H. 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish & Shellfish Immunology 32: 407-410.
33- Sheikhzadeh N, Heidarieh M, Karimi Pashaki A, Nofouzi, K, Ahrab Farshbafi M, Akbari M. 2012. Hilyses, fermented (*Saccharomyces cerevisiae*), enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish & Shellfish Immunology 32: 1083-1087.
34- Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. 2003. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection, Microbes and Infection 5: 1337-1344.
35- Shiry N, Khoshnoodifar K, Alavinia SJ. 2020. Cutaneous mucosal immune-parameters and intestinal immune-relevant genes expression in streptococcal-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A comparative study with the administration of florfenicol and olive leaf extract. Fish & Shellfish Immunology. 107: 403-410. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.023

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 9, Issue 4, Fall 2020
Pages: 244-256

Effects of the Na diformate and citric acid oral use on some skin mucosal immunity indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following experimental challenge with Yersiniosis

Nima Shiry[1*], Mohammad Javad Mohammadi[2]

1- Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources. Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Khorramshahr, Iran.

A B S T R A C T

The present study intends to assess the effects of Na diformate oral use with citric acid on some skin mucosal immunity indices (total protein, total immunoglobulin (TIg), lysozyme, protease, esterase, and alkaline phosphatase (ALP)) of rainbow trout following experimental challenge with Yersiniosis agent *(Yersinia ruckeri).* Subsequent to the determination of the 7-day median lethal dose (LD50) of *Y. ruckeri*, fish were stocked in eight groups and two repetitions. The acidifiers separately with a dose of 0.2%, and combined 0.1+0.1% was added to the commercial diet. Five days after inoculation, feeding of fish with acidifiers commenced, and following 15 days, the mucus samples were gathered from the skin of anesthetized fish to measure immune indices. Results showed that the 7-day LD50 of *Y. ruckeri* was 8.91×105 CFU/ml. In the main experiment, findings indicated the significant effect of Na diformate on the increased levels of mucoid total protein and proteolytic activity of healthy or diseased fish. The acidifiers-contained diet because of potentially having synergistic effect caused inducing the mucus TIg. It seems that the orally use of Na difirmate in 0.2% of the diet separately or combined with citric acid, at least for 15 days, can improve the cutaneous mucus immunological indices that its result is an increase in the survival rate of farmed rainbow trout.

ARTICLE TYPE
Original Research

ARTICLE HISTORY
Received:
Accepted:
ePublished:

KEYWORDS: Acidifier, Immunostimulant, Mucosal immunity, Rainbow trout, *Yersinia ruckeri.*

* Corresponding Author:
Email address: nima.shiry@gmail.com
Tel: +98
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1399.9.4.1.0]