فصلنامه علمی- پژوهشی
دورهٔ ۳، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۸۷- ۹۲

مقاله کوتاه علمی

اثر بتاگلوکان (ماکروگارد) بر برخی از شاخص‌های ایمنی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)

مهرانگیز انتظار یزدی[1*]، مهدی سلطانی[2]، رحیم میرزایی[3]، هومن رجبی اسلامی[4]

۱- کارشناس ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران.
۲- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران.
۳- استادیار، مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران.
۴- استادیار، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران.

دریافت: ۹۲/۰۴/۱۰ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۱

* نویسنده مسئول مقاله: mhb_boys@yahoo.com

بی‌شک بالا بودن تراکم پرورش اثر معکوسی بر وضع سلامتی و بهداشت ماهی خواهد گذاشت و این وضعیت سبب ایجاد شرایط محیطی نامناسب و استرس‌زا و همچنین افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری می‌شود. این افزایش حساسیت موجب بالا رفتن خطر بیماری در ماهیان می‌شود (Soltani ،2008). به‌طوری‌که امروز در اغلب کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممنوع یا با محدودیت‌های شدیدی مواجه شده است (Pooramini and Hosseinipoor،2007).

در ماهیان سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی، یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود و تقویت این سیستم برای ماهیان پرورشی بسیار ارزشمند است، زیرا ماهیان در شرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت‌طلب آسیب‌پذیرند (Dixon and Stet, 2001).

مطالعات بیانگر تأثیر بتاگلوکان (ماکروگارد) در دزهای مختلف بر سیستم ایمنی و رشد گونه‌های مختلف ماهی بوده است که از جمله می‌توان به ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط Pionnier و همکاران (2013)، گربه ماهی کانالی (*I. punctatus*) توسط Welker و همکاران (2007)، ماهی شوریده (*Pseudosciaena crocea*) توسط Ai و همکاران (2007)، روهو (*Labea rohita*) توسط Misra و همکاران (2006)، ماهی باس دریایی (*Dicentrachus labrax*) توسط Bagni و همکاران (2005) اشاره کرد.

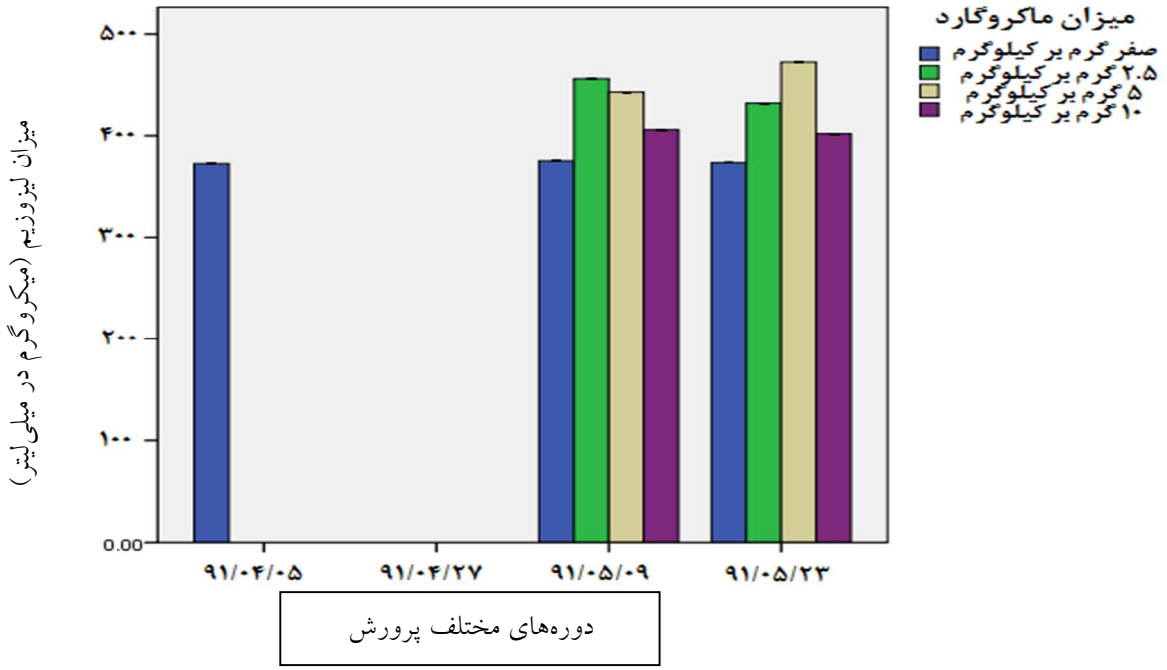
هدف از مطالعه تعیین اثرهای سطوح مختلف ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد محرک ایمنی ماکروگارد بر میزان گلبول‌های سفید، فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی اسکار و تقویت سیستم ایمنی ماهی اسکار با استفاده از سطوح مطلوب ماکروگارد، با استفاده از سطوح مطلوب ماکروگارد است.

در این تحقیق ۸ عدد آکواریوم در ابعاد ۷۰×۳۰×۵۰ سانتی‌متر، در آزمایشگاه شیلات دانشگاه علوم و تحقیقات تهران از ابتدای تیر تا اواخر مرداد سال ۱۳۹۱، به مدت ۵۰ روز مورد استفاده قرار گرفت. آکواریوم‌ها به میزان ۸۰ تا ۹۰ لیتر با استفاده از آب آزمایشگاه آبگیری شدند. لازم به ذکراست که منبع تأمین‌کننده آب آزمایشگاه، آب چاه بود که بدون کلر بوده و نیازی به کلرزدایی نداشت. سپس آکواریوم‌ها به مدت ۲۴ ساعت هوادهی شد و آماده پذیرش ماهیان اسکار گردیدند. تعداد ۱۰۰ عدد ماهی اسکار با میانگین وزن ۴/۳۵±۲۳/۲۵ گرم تهیه شد. پس از یک هفته، ۴ ماهی به‌طور تصادفی انتخاب شد و پس از بیهوش کردن آن‌ها با عصاره گل میخک و اندازه‌گیری طول و وزن آن‌ها با قطع ساقه دمی، از خون هر ماهی ۳ تا ۵ لام تهیه گردید. ماهیان اسکار به مدت ۶ هفته (Misra et al., 2006) با افزودن ماکروگارد در سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد به جیره غذایی و بر اساس حداکثر ۳ درصد وزن توده زنده در ۳ نوبت (۹ صبح، ۱۲ ظهر، ۱۵ عصر)، تغذیه شدند. برای تعیین توده زنده هر یک از آکواریوم‌ها هر دو هفته یک بار ۱۰۰ درصد ماهیان هر آکواریوم با ترازوی دیجیتال وزن شده و به‌وسیله کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر، طول کل آن‌ها اندازه‌گیری شد. در ابتدای دوره و پس از گذشت یک هفته از دوره سازگاری، تعداد ۴ عدد ماهی اسکار به‌صورت تصادفی انتخاب و با قطع ساقه دمی خون‌گیری انجام شد. به علت کوچک بودن ماهیان میزان خون در حدی نبود که بتوان سرم‌گیری کرد. در این مرحله، از خون هر ماهی ۳ تا ۵ عدد لام برای مطالعه گلبول‌های سفید تهیه شد. پس از این مرحله هر ۱۵ روز یک بار، به‌طور تصادفی از هر آکواریوم ۳ عدد ماهی گرفته شد و به روش قطع ساقه دمی خون‌گیری انجام شد. برای اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (معادل مقدار ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری در بافر سدیم سیترات ۰/۰۲ مولار با pH برابر۵/۵) تهیه کرده، سپس ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه سرم را با ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مخلوط کرده و جذب نوری در دقیقه اول و چهارم، به روش طیف سنجی و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (*Biophotometer*) قرائت شد (Sankaran and Gurnani, 1972). بافر سیترات سدیم به‌عنوان بلانک استفاده شد. شاخص‌های خونی شامل درصد سلول‌های خونی مانند لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، منوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها است که در هفته‌های مختلف زیست سنجی و در تیمارهای مختلف بررسی شد. تعداد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در گروه‌های آزمایشی افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد داشته‌اند. بیش‌ترین افزایش در نوتروفیل‌ها مربوط به هفته چهارم زیست سنجی است که در ماهیانی با جیره غذایی محتوای ۱ درصد ماکروگارد تغذیه شده بودند، مشاهده می‌گردد. همچنین کاهش تعداد نوتروفیل‌ها در هفته ششم مشاهده می‌گردد. تعداد نوتروفیل‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی در هفته‌های مختلف، افزایش معناداری را نسبت به گروه شاهد نشان داده‌اند ($p<0/05$). همچنین مشاهده می‌گردد که در هفته چهارم تعداد نوتروفیل‌ها در گروه‌های آزمایشی بیش‌ترین افزایش را نسبت به گروه شاهد داشته‌اند و این افزایش نوتروفیلی در ماهیانی با جیره غذایی ۱ درصد ماکروگارد، نسبت به بقیه گروه‌ها و گروه شاهد بیش‌تر بوده است. در هفته ششم زیست‌سنجی نسبت به هفته چهارم، تعداد نوتروفیل‌ها در تمام گروه‌ها کاهش یافته است. مؤثرترین دزها در افزایش منوسیت‌ها،

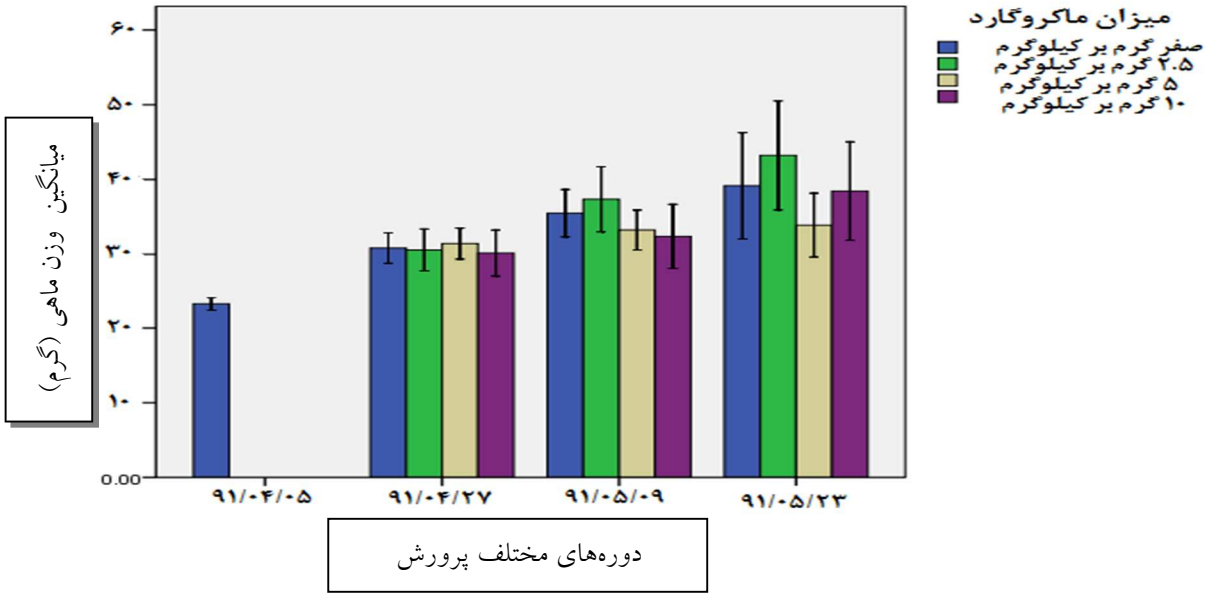
در هفته‌های دوم و چهارم زیست‌سنجی، دز ۰/۵ و ۱ درصد ماکروگارد بوده است، ولی در هفته ششم دز ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد ماکروگارد مؤثر بوده‌اند (p<۰/۰۵). هفته دوم زیست‌سنجی تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد دارای افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد بوده‌اند (p<۰/۰۵)، ولی با افزایش مدت آزمایش تعداد لنفوسیت‌ها در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است.

تعداد ائوزینوفیل‌ها در گروهای مختلف آزمایشی و همچنین در هفته‌های مختلف اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). موثرترین دز ماکروگارد در هفته‌های چهارم و ششم دز ۰/۲۵ درصد ماکروگارد بوده است (p<۰/۰۵).

میزان لیزوزیم در پایان هفته چهارم و ششم در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشته است (p<۰/۰۵) ولی این تغییرات در گروه‌ها و زمان‌های مختلف، متفاوت بوده است. میزان لیزوزیم در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشته است (p<۰/۰۵)، ولی این افزایش در طول مدت آزمایش و در تیمارهای مختلف متفاوت بوده است. به‌طوری‌که در پایان هفته چهارم گروه آزمایشی ۰/۲۵ درصد ماکروگارد نسبت به گروه‌های دیگر و گروه شاهد بیش‌ترین مقدار لیزوزیم را داشته، ولی در پایان هفته ششم گروه آزمایشی ۰/۵ درصد ماکروگارد بیش‌ترین مقدار لیزوزیم را نسبت به بقیه گروه‌ها دارا بوده است. لازم به ذکر است به علت کوچک بودن ماهیان در هفته دوم زیست‌سنجی قادر به تهیه سرم از این ماهیان نبوده‌ایم (شکل ۱).



شکل ۱ مقایسه میزان لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر سرم) در گروه‌های مختلف آزمایشی و در هفته‌های مختلف زیست‌سنجی (تعداد نمونه: ۶ عدد ماهی به ازای هر تیمار)



شکل۲ مقایسه روند وزن ماهیان اسکار طی هفته‌های مختلف زیست‌سنجی

همچنین در پایان هفتهٔ‌دوم زیست‌سنجی مشاهده شد که بدون هیچ تلفاتی، ماهیان تغذیه‌شده با محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۰/۵ درصد رشد بهتری را نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌ها در مدت دو هفته نشان داده‌اند. همچنین ماهیانی که با محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۱ درصد تغذیه شده بودند، نسبت به گروه شاهد از افزایش رشد کم‌تری برخوردار بوده‌اند. در هفته چهارم تغذیه با سطوح مختلف ماکروگارد مشاهده می‌گردد که ماهیان تغذیه‌شده با محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۰/۲۵ درصد رشد بهتری را نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌ها در مدت ۴ هفته نشان داده‌اند. ماهیان تغذیه‌شده با محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۱ درصد رشد کم‌تری را نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌ها در مدت ۴ هفته نشان دادند. ماهیان تغذیه‌شده با محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۰/۵ درصد رشد کم‌تری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند، ولی نسبت به گروهی که با ماکروگارد ۱ درصد تغذیه شده بودند، در وضعیت بهتری قرار داشتند.

همچنین با توجه به نتایج زیست‌سنجی در هفته ششم تغذیه با سطوح مختلف ماکروگارد مشاهده می‌گردد که ماهیان تغذیه‌شده از محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۰/۲۵ درصد رشد بهتری را نسبت به گروه شاهد و بقیه گروه‌ها در پایان هفته ششم نشان داده‌اند. ماهیانی که از محرک ایمنی ماکروگارد در سطح ۰/۵ درصد تغذیه کرده بودند، پس از ۶ هفته رشد کم‌تری نسبت به گروه شاهد و تمامی گروه‌ها نشان دادند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از فاکتورهای ایمنی در ماهیان اسکار مشاهده می‌شود همان‌طور که محققان بیان کرده بودند، استفاده از ماکروگارد بستگی به میزان دز مصرفی و مدت استفاده از آن دارد و اثرهای مختلفی بر فاکتورهای ایمنی ماهیان می‌گذارد. همچنین محققان اثر بتاگلوکان (ماکروگارد) موجود در جیره غذایی با میزان ۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن ماهی به مدت ۱۴ روز بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) آلوده به عفونت باکتریایی *A. salmonicida* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تغذیه با بتاگلوکان باعث افزایش

معناداری در میزان سطح CRP[1] سرم تا دو برابر و آلترناتیو کمپلمانت تا ۳۵ برابر شد و همچنین اثر معناداری بر منحنی CRP و کمپلمانت سرم گذاشته و باعث افزایش سطح آن‌ها نسبت به گروه کنترل بوده است. Pionnier و همکاران (2013) اثر محرک ایمنی بتا ۱ و۳ گلوکان را بر ایمنی ذاتی ماهی (*Cyprinus carpio koi*) به مدت ۵۶ روز بررسی کردند. نتایج ۸ هفته نشان داد که مکمل غذایی باعث افزایش معناداری در رشد و ایمنی این ماهیان شد. Lin و همکاران (2011) اثرهای دز کم (۰/۰۹ درصد) و دز زیاد (۰/۰۱۸ درصد) بتاگلوکان در جیره غذایی را به مدت ۸ هفته بر ماهی *Pseudosciaena crocea* با میانگین وزنی ۹ گرم و نیز ایجاد مقاومت در برابر باکتری *Vibrio harveyi* مطالعه کردند. نتایج نشان داد که با افزایش دز، میزان فعالیت لیزوزیم، میزان بیگانه‌خواری و انفجار تنفسی نیز افزایش یافته است. Ai و همکاران (2007). اثرهای سطوح ۱۰۰ و ۲۵۰ و ۵۰۰ گرم بر کیلوگرم بتاگلوکان (ماکروگارد) در جیره غذایی را به مدت ۸ هفته بر فاکتورهای ایمنی و رشد بچه ماهیان انگشت قد روهو (*Labea rohita*) با میانگین وزنی ۳۵ گرم مطالعه کردند. افزایش معناداری در تعداد گلبول‌های سفید، غلظت لیزوزیم و غلظت پروتئین سرم خون در سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ مشاهده شد. Misra و همکاران (2006) اثرهای کوتاه مدت (۱۵ روزه) و دراز مدت (۶۰) روزه در سطح ۰/۱ درصد ماکروگارد را بر واکنش‌های ایمنی ماهی باس دریایی (*Dicentrachus labrax*) با میانگین وزنی ۸۰ گرم ارزیابی کردند. در این آزمایش اختلاف معناداری بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی در میزان لیزوزیم مشاهده شد. در بررسی اثر ماکروگارد بر ایمنی ماهیان اسکار مشاهده شد که ماکروگارد در تمام سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد، باعث افزایش معناداری در سلول‌های خونی، به‌خصوص نوتروفیل‌ها نسبت به گروه شاهد شد (Bagni et al., 2005). مؤثرترین دز، در افزایش نوتروفیل‌ها دز ۱ درصد بود. همچنین مصرف ماکروگارد در تمامی سطوح باعث افزایش معناداری در میزان لیزوزیم سرم خون شد که این افزایش بستگی به دز مصرفی و مدت استفاده از آن داشت، به‌طوری که در پایان هفته چهارم مؤثرترین دز، ۰/۲۵ درصد ماکروگارد بود ولی در پایان هفته ششم مؤثرترین دز ۰/۵ درصد بود. بنابراین در این تحقیق میزان تأثیر گلوکان‌ها بر موجودات و سیستم ایمنی آن‌ها بستگی به میزان درصد آن در جیره غذایی، زمان تغذیه و همچنین نوع گونهٔ مورد مطالعه دارد. همچنین افزایش زمان مصرف ماکروگارد اثر منفی بر ایمنی ماهیان خواهد داشت و مصرف ماکروگارد در زمان‌های طولانی باعث کاهش ایمنی در این ماهیان می‌شود. برای حصول اطمینان جهت تعیین دز مؤثر بر فاکتورهای ایمنی نیاز به تحقیقات بیش‌تری است.

منابع

Ai, G., Mai, K., Zhang, L., Tan. B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H. 2007. Effect of dietary B-1, 3 glucan on innat immune response of larg yellow croaker *(Pseudosciaena crocea). Fish and Sellfish Immunology*, 22: 394-402.

Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Ahelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. and Marino, G. 2005. Short and long term effect of a diatary yeast B-glucan (Macrogard) and alganic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrachus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology*, 18: 317-325.

Dixon, B. and Stet, R. G. M. 2001. The relationship between major his to compatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental and comparative Immunology*, 25:683-700.

۱. C-reactive protein

Pooramini, M. and Hosseinifar, S. 2007. pero and glut biyotekha in aquatic nurture. Moje-Sabz press. 104p. (In Persian)

Soltani, M. 2008. Immunology of fishes and crustacean. Tehran Univ. Press. 264p. (In Persian)

Sankaran, K. and Gurnani, S. 1972. On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 9(2): 162-165.

Welker, T. L., Lim, C., Yildrim-Aksoy, M., Shelby, R. and Klesius, P. H. 2007. Response and resistance to stress and *Edvardsiella ictaluri* challenge in channel catfish*, Ictalurus punctatus*, fed diets containing whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(1): 24-35.

Lin, S. Pan, Y. Luo, L. and Luo, L. 2011. Effects of dietary b-1, 3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi), *Fish and Shellfish Immunology*, 31: 788-794.

Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. and pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary B-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255: 82-94.

Pionnier, N. Falco, A. Miest, J. Frost, P. Irnazarowb, I. Shrive, A. and Hoole, D. 2013. Dietary ß-glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during an *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(3): 819-831.

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 3, No. 2, Summer 2014

Short Communication

Effect of β-glucan (Macrogard) on immune parameters of Oscar (*Astronotus ocellatus*)

Mehrangiz Entezar-yazdi[1*], Mehdi Soltani[2], Rahim Mirzaie[3] and Houman Rajabi Eslami[4]

1- M.Sc. graduated of fisheries, Fisheries department, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran.
2- Professor, Aquatic Animal Health and Diseases Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran.
3- Assistant Prof., Applied Science Institute of Agricultural Management Organization, Tehran.
4- Assistant Prof., Fisheries department, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran.

Received: 01/07/2013 Accepted: 02/12/2013

* Corresponding author: mhb_boys@yahoo.com

Abstract:

In this study, 100 fish (*Astronotus ocellatus*) with density of 8 to 12 fish per aquarium distributed to four treatments (Control, 0/25%, 0/5% and %1 Macrogard) the experiment lasted for six weeks. In this experiment it was observed that the number of white blood cells, especially neutrophils and serum the lysozyme level in fish fed with different levels Macrogard were significantly increased compared to the control group (p<0/05). Most changes in the white blood cell count was observed in fourth week of feeding for all Macrogard levels. This material affects the immune system of *Astronotus ocellatus*, and we can say that the all levels Macrogard were safe. They are most effective when the fish are fed for 4 weeks with diets containing Macrogard.

Keywords: *Astronotus ocellatus*, immune stimulation, Macrogard, ß-glucan, immune parameters, N-acetyl muramidglycanohydrolase.