# بررسی اثر جلبک *Dunaliella salina* بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgM، IgG، IgA و IgE در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus myksis*)

**پریسا امانی‌نژاد[۱]*، حسین عمادی [۲]، مژگان امتیاز جو [۳] و همایون حسین‌زاده صحافی[۴]**

۱ و ۲ـ گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی،دانشکده علوم وفنون دریایی، واحد تهران شمال

۳ـ گروه زیست دریا، دانشگاه آزاد اسلامی،دانشکده علوم وفنون دریایی، واحد تهران شمال

۴ـ سازمان تحقیقات شیلات ایران، تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۹ تاریخ پذیرش:۹۱/۲/۱۵

## چکیده

**این مطالعه به بررسی اثر جلبک *Dunaliella salina* برتغییرات ایمونوگلوبین‌ها و نرخ ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌پردازد. شاخص‌های استفاده شده دراین مطالعه تعیین میزان ایمونوگلوبین‌های IgM، IgG، IgA و IgE خون و بررسی تغییرات در شاخص‌های ایمنی و درصد تلفات ماهیان بوده است. ماهی‌ها در ۵ تیمار با تراکم جلبک دونالی یلای خالص به مقادیر صفر (شاهد)، ۵، ۷، ۹و ۱۱گرم در کیلوگرم غذا به مدت ۳ماه تغذیه شدند و سپس در دو مرحله، یکی در ابتدای ماه اول)ماهیان ۱+_۱۰۰ گرمی) شاهد ۱ و دیگری پس از اتمام ماه سوم پرورش (ماهیان ۱۰+_۵۰۰گرمی) شاهد۲ به علاوه ۴ تیمار، برای گرفتن خون به طور تصادفی انتخاب (به تعداد ۲۵ عدد) شدند و نمونه‌های خون جهت سنجش ایمونوگلوبولین به آزمایشگاه، فرستاده شد. نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد، که سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgM و IgA در پلاسمای ماهی-هایی که با جلبک دونالی یلا تغذیه شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه شاهد می‌باشند. سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgM و IgA با افزایش مقدار جلبک دونالی یلا و زیاد شدن وزن افزایش یافت. میزانIgM و IgA به ترتیب به میزان (۱ ± ۱۰) و (۱ ± ۲) میلی گرم در دسی لیتر در پلاسمای ماهی‌ها افزایش یافت. سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgG و IgE تغییری در جهت افزایش از خود نشان ندادند. نتایج حاصل از ثبت درصد تلفات مشخص نمودند که ماهیان در وزن‌های مختلف تلفاتی نشان ندادند که این موضوع حاکی از سازش‌پذیری قابل توجه آن‌ها با شرایط تغذیه‌ای می‌باشد. توجه به نتایج حاضر نشان می‌دهد که روند تغییرات ایمونولوژیک در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در نتیجهٔ تغذیه با جلبک دونالی یلا افزایش می‌یابد. افزایش این شاخص‌ها نشان دهندهٔ این است که بتاکاروتن موجود در این جلبک به شکل قابل توجهی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را تحریک نموده و باعث افزایش مقاومت آن می‌گردد.**

**واژگان کلیدی**

قزل‌آلای رنگین کمان، ایمونوگلوبولین، جلبک دونالی یلا (*Dunaliella salina*)

* نگارنده پاسخگو: Parisaamaninejad@yahoo.com

**مقدمه**

دونالی یلا از جلبک‌های سبز دوتاژکه تک سلولی و بدون دیوارهٔ سلولی است. گونه تیپیک آن *Dunaliella salina* می‌باشد. این جنس اولین بار توسط دونال در سواحل مدیترانه‌ای فرانسه بدست آمد (Dunal,1838). پس از آن در سال ۱۹۰۵ توسط Teodoresco توصیف شد و به نام دونال نام‌گذاری گردید. این شخص اولین کسی بود که دریافت رنگ قرمز آبگیرهای فوق اشباع از نمک بدلیل وجود این جلبک است ( Teodoresco,1905). جلبک *Dunaliella salina* یکی از بهترین جنس‌های مورد مطالعه در شاخه Chlorophyta با ۲۷ گونه می‌باشد. گونه فوق، گونه‌ای بسیار مهم در رابطه با تولیدات اولیه در آب‌های با شوری بالا در مناطق مختلف جهان می‌باشد. دونالی یلا سالینا از جمله جلبک‌های ریز دریایی است که حاوی رنگدانه بتاکاروتن و اسیدهای حلال مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیانین، پلی ساکاریدها، آهن و روی می‌باشد(Qureshi & Ali, 1996).

بتاکاروتن یکی از رنگدانه‌های طبیعی باخاصیت آنتی اکسیدانی قوی است (Edge *et al*., 1997) و به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی که این رنگدانه دارد، از آن در تهیه مکمل‌های غذایی و مواد دارویی استفاد می‌شود(Tim *et al*., 2007 ).این رنگدانه می‌تواند تا بیش از ۱۰ درصد وزن خشک این جلبک که در معرض شرایط معینی از نور قرار گرفته باشد را تشکیل دهد(Ben-Amotz *et al*., 1982). تغذیه با این جلبک، به دلیل وجود مقدار فراوان بتاکاروتن باعث افزایش فعالیت کمپلمان (عامل مکمل) و به عبارت دیگر باعث افزایش فعالیت لیزوزیم شده و در نتیجه باعث افزایش سطح ایمونوگلوبولین‌های خون می‌شود(Amar *et al*., 2004). در سال Wang,۲۰۰۶ و همکاران اثر این جلبک را روی فاکتورهای رشد، درصد بقا، رنگ پوست، گوشت و هم چنین توانایی آنتی اکسیدانی آن روی ماهی بررسی کردند. نتیجه این آزمایش نشان داد که بتا کاروتن، باعث افزایش رنگدانه در پوست و گوشت ماهی،افزایش وزن، کاهش درصد تلفات و در نهایت باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی (سوپراکسیداز و پرواکسیداز) می‌شود. هم چنین تاثیر پودر خشک شده این جلبک، روی رشد، عملکرد ایمنی و کاهش بیماری در میگوی ببری سیاه مورد آزمایش قرار گرفت که باعث افزایش وزن و کاهش عفونت ویروسی سندرم بیماری لکه سفید و هم چنین باعث کاهش استرس در میگو می‌شود. لازم به ذکر است که شدت رنگ در این میگو، با مقدار جلبک موجود در جیره غذایی ارتباط مستقیم دارد. در سال‌های اخیر استفاده از دونالی یلا سالینا به عنوان منبع غذا و یا در ترکیب با دیگرارگانیسم‌های دریایی مانند روتیفر و آرتمیا به عنوان استاندارد، در آکواریوم و هچری مورد استفاده قرار گرفته، که علاوه برافزایش وزن، باعث بهبود رنگ آبزیان و بالا بردن کیفیت چربی در میکروارگانیسم‌های دریایی می‌شود (Wang *et al*.,2006 ).

در این تحقیق دو هدف شامل اثر جلبک (*Dunaliella salina*) بر سیستم ایمنی و فیزیولوژی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و بررسی امکان کاربرد این گونه در پرورش ماهی قزل آلا در راستای بهره‌گیری از خواص مثبت ایمنی و فیزیولوژیک و دیگر بررسی خاصیت ضد سرطانی وآنتی اکسیدانی آن در جهت افزایش توان سیستم ایمنی و تغییر در شاخص‌های ایمنی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش کار**

مراحل نمونه‌برداری این بررسی در کارگاه تکثیر و پرورش امامزاده علی واقع در ۷۵ کیلومتری شهر تهـران، جـاده هراز، در کنار رودخانه لار در دی ماه سال ۱۳۸۸به مدت ۳ ماه انجام پذیرفت. ۴۵۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با نژاد فرانسوی با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم، در پنج گروه در حوضچه‌های سیمانی با ابعاد ۳۷×۱۰×۱۹۵ سانتی‌متـر کـه به سه قسمت مساوی تقسیم شـده بودنـد، بـا میـزان آب ورودی ۱/۵ لیتـر در ثانیـه نگهـداری شـدند. در طـی دورهٔ سازگاری و پیش از آغاز تغذیه با جیره‌های آزمایشی، ماهی‌ها به مدت ۱۴روز بـا غـذای قـزل‌آلای GFT2 غـذا دهـی

شدند. سپس ماهیان با ۴ جیره آزمایشی به علاوه یک شـاهد(شـاهد۲) هـر کـدام در ۵ تکـرار در یـک دورهٔ ۹۰ روزه تغذیه شدند، ماهی‌ها ۲ بار در روز (ساعت‌های ۱۰ و ۱۶) و به مدت ۷ روز هفته به طور دستی غذادهی شدند. میـزان غذا برای هر تیمار روزانه محاسبه و توزین شده و در اختیار ماهی بر مبنای ۱/۸درصد وزن بدن قـرار گرفـت (بـاقری، ۱۳۸۸). غذای دان مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Skretting ایتالیا بود که ترکیبـات آن در جـدول (۱) ارائـه شده است.

**جدول ۱ـ ترکیب غذای پایه مورد استفاده بر حسب درصد**

| ترکیبات | مقدار بر حسب درصد |
|---|---|
| پروتئین خام | ۴۳ |
| چربی خام | ۱۲ |
| فیبر | ۲/۸ |
| خاکستر | ۶/۸ |
| فسفر | ۰/۹ |

به دلیل اینکه هر گرم از این گونه دارای ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم بتاکاروتن است (باقری،۱۳۸۸). میزان جلبک خالص مورد نیاز برای هرکیلوگرم غذا در تیمارهای مشخص شده ۵، ۷، ۹ و ۱۱گرم بود، ولـی از آن جـا کـه جلبـک خشـک شده مورد استفاده در این تحقیق دارای ۳۰ درصد نمک بود، لذا به هر کیلوگرم غذا به ترتیب ۱۰/۵،۷، ۱۲/۵ و ۱۵/۵ گرم جلبک اضافه گردید.

جلبک مورد نیاز از موسسه تحقیقات علمی ـ صنعتی ایران، آزمایشگاه بیوتکنولـوژی فـراهم گردیـد. نمونـه ایـن جلبک برای کشت از دریاچه حوض سلطان (نزدیکی شهر قم) در اردیبهشت مـاه، در دمـای ۴۸ درجـه سـانتی گـراد جمع آوری شده و بعد از خالص سازی و کشت دادن در آزمایشگاه و قرار گرفتن در شرایط خـاص (اسـترس نـوری و افزایش غلظت نمک از ۱۵ درصد به ۳۰ درصد) تولید رنگدانه بتاکاروتن نمود. سپس به وسیله دستگاه سـانتریفیوژ بـا نام تجاری Separator (مدل ۲۰۴ و MAB، - ۸۴۰۰ دور در دقیقه، ساخت سوئد) جلبک از محیط کشت جمع آوری گردید و پس از خشک کردن به شکل آرد جلبک با ۳۰ درصد نمک در آزمایش مورد استفاده قـرار گرفـت. آب مـورد نیاز از چشمه‌ای که در بالا دست کارگاه قرارداشت،تامین شد که طی دورهٔ آزمایش، دمای آب ۱+۱۴درجه سانتی‌گراد و میزان پی اچ و اکسیژن محلول در آب به ترتیب ۷/۵ و ۹/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم گردید.

عملیات نمونه‌برداری در یک دورهٔ سه ماهه صورت گرفت، به طوری که در ابتـدای مـاه اول(شـاهد۱) ۲۵نمونـه از ماهیان ۱ ± ۱۰۰ گرمی که با جلبک دونالی یلا سالینا تغذیه نشده بودند و با غذای قزل‌آلای GFT2 غذا دهـی شـده بودند، خونگیری صورت گرفت و در انتهای ماه سوم از ماهیان ۱۰ ± ۵۰۰ گرمی از گروه شاهد (شـاهد۲) و تیمارهـا (۴ تیمار) به همراه گروه‌های تکرار، به صورت تصادفی از هر مخزن ۵ ماهی( ۲۵ نمونه) برداشت شد. ماهیان با عصارهٔ گل میخـک (۵۰۰۰ : ۱) بیهـوش شـده (مهرابـی، ۱۳۷۸) و از طریـق قطـع سـاقهٔ دمـی خـونگیری انجـام پـذیرفت (کلباسی،۱۳۷۸). هدف از خونگیری از ماهیان شاهد (۱)و مقایسه آن با ماهیان شاهد (۲)، بررسی این موضوع بود که ماهیان ۱۰۰ گرمی پس از رشد طبیعی و افزایش وزن (۱۰ ± ۵۰۰گرمی) توان سیسـتم ایمنـی آنهـا بـه چـه میـزان افزایش می‌یابد (توجه به این نکته مهم است که تفاوت شاهد ۱و شاهد ۲ در وزن ماهیان است و گروه شاهدهـا هـیچ جلبکی دریافت نکرده اند).خون هر نمونه به صورت جداگانه به درون لوله آزمایش انتقال یافت. لوله‌های آزمایشـگاهی حاوی خون داخل فلاسک یخ قرار داده شد و به سرعت به آزمایشگاه "همت" انتقال داده شد تا شـاخص‌هـای مـورد

نظر در خون این ماهیان مورد بررسی قرار گیرد. در آزمایشگاه، لوله‌های شیشه‌ای در داخل دستگاه سانتریفیوژ بـا دور ۴۶۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سرم خون تا زمان انجام آزمایش‌های نهـایی در فریـزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. شاخص‌های IgM، IgG، IgA با استفاده از کیت‌های تجاری مخصـوص (شـرکت پارس آزمون) با شماره ۱-۸۸۰۰۱ و براساس روش ایمونوتوربیدی متریک (Thomas,1998) و شاخص IgE بـه روش الایزا (دیوی و برنارد، ۱۹۹۶) با دستگاه Cobasmira (Roche) با دقت ۰/۱ اندازه‌گیری و خوانده شد.

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های کمی از آنالیزواریانس یک طرفه One-Way-ANOVA و برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف‌معنی‌دار بین میانگین تیمارها از آزمون دانکن در سطح احتمال(P<۰/۰۵) استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در شکل‌ها به صورتMean + SE ارائه شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کلموگروف اسمیرنوف و برای بـــررسی همگنی داده‌ها از آزمون لون (Leven) در نرم‌افزار SPSS استفاده شد(Zar,1999).

## نتایج

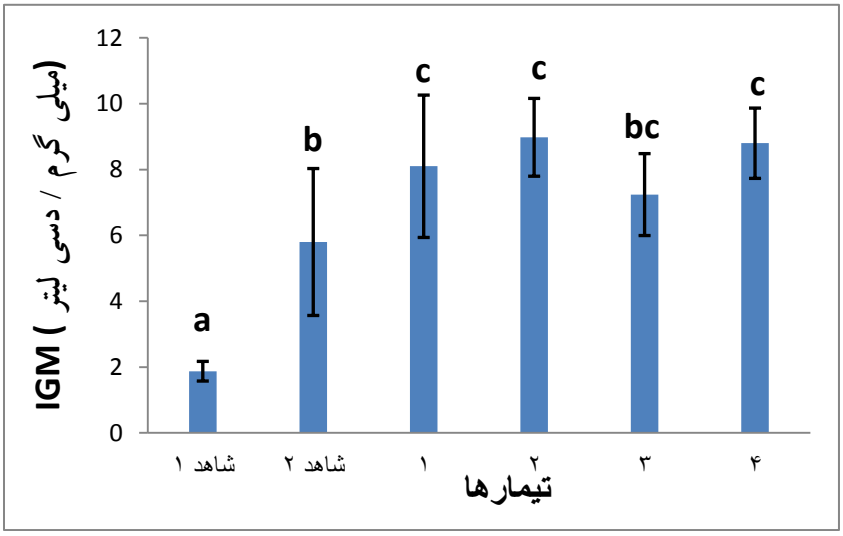
نتایج حاصل از سنجش ایمونوگلوبولین‌های IgMوIgA در دوره‌ی ۹۰ روزآزمایش به صورت میانگین در جدول(۲) آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین IgM در نمونه‌های شاهد۱ با مقدار۰/۲۹ ± ۱/۸۷ میلی گرم در دسی لیتر کمتر از میانگین IgM در نمونه‌های شاهد ۲ با مقدار۲/۲۳ ±۵/۸ میلی گرم در دسی لیتر بود.بیشترین میزان IgM در تیمار ۲ با مقدار ۱/۱۸ ± ۸ /۹۸ میلی گرم در دسی لیتر و کمترین میزان آن در تیمار ۳ با مقدار ۱/۲۴ ± ۷/۲۴ میلی گرم در دسی لیتر مشاهده شد.طبق این جدول میانگین IgA در نمونه‌های شاهد ۱ با مقدار ۰/۱۹ ± ۰/۷۸ میلی گرم در دسی لیتر کمتر از میانگین IgA در نمونه‌های شاهد ۲ با مقدار ۰/۳۱ ± ۱/۸ میلی گرم در دسی لیتر بود. بیشترین میزان IgA در تیمار ۱ با مقدار ۰/۱۳ ± ۲/۱۲ میلی گرم در دسی لیتر و کمترین میزان آن در تیمار ۳ و ۴ با مقدار ۰/۱۱ ± ۱/۹ میلی گرم در دسی لیتر دیده شد.

**جدول۲ـ میانگین تغییرات میزان ایمونوگلوبولین‌های IgMو IgA در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک دونالی یلا از زمان شروع و سه ماه پس از پرورش**

| زمان | تیمارهای آزمایشی | میانگین | | انحراف معیار | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | IgM (میلی‌گرم/ دسی لیتر) | IgA (میلی‌گرم/ دسی لیتر) | IgM (میلی‌گرم/ دسی لیتر) | IgA (میلی‌گرم/ دسی لیتر) |
| | شاهد ۱ | ۱/۸۷ | ۰/۷۸ | ۰/۲۹ | ۰/۱۹ |
| شروع آزمایش | شاهد ۲ | ۵/۸۰ | ۱/۸ | ۲/۲۳ | ۰/۳۱ |
| | تیمار ۱ | ۸/۱۰ | ۲/۱۲ | ۲/۱۶ | ۰/۱۳ |
| ۳ ماه | تیمار۲ | ۸/۹۸ | ۲/۰۸ | ۱/۱۸ | ۰/۲۲ |
| بعد | تیمار ۳ | ۷/۲۴ | ۱/۹۰ | ۱/۲۴ | ۰/۱۵ |
| | تیمار ۴ | ۸/۸۰ | ۱/۹۰ | ۱/۰۶ | ۰/۱۱ |

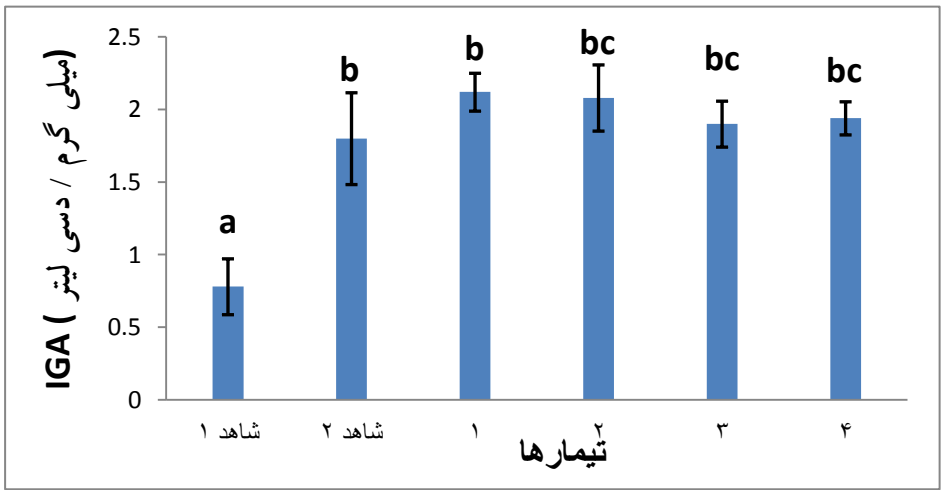
نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد، که میزان سطح ایمونوگلوبولین IgM، در پلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با جلبک دونالی یلا سالینا، در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد (۲) افزایش معنی‌داری (P <۰/۰۵) دارد. سطح ایمونوگلوبولین ام (IgM)، درتمامی تیمارها افزایش داشت، به طوری که این افزایش ۱+۱۰ میلی گرم در دسی لیتر

بود. بیشترین میزان IgM، متعلق به تیمار ۲و پس از آن به ترتیب تیمار ۴و ۱بود. نکته قابل توجه اختلاف معنی‌داری است، که بین ماهی‌های گروه شاهد ۱ در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد ۲ مشاهده شد.




**شکل ۱ـ نمودارمیانگین تغییرات IgM و انحراف معیارهای مربوطه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای آزمایشی در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* حروف متناوب، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.**
**(آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)**

میزان سطح ایمونوگلوبولین آ (IgA)، درپلاسمای ماهی‌های تغذیه شده با جلبک دونالی یلا، در مقایسه با مـاهی-های گروه شاهد ۱ افزایش معنی‌داری داشت. (P <۰/۰۵) سطح ایمونوگلوبولین آ (IgA) در تمـامی تیمارهـا افـزایش یافته، به طوری که میزان افزایش ۱+۲ میلی گرم در دسی‌لیتر دیده شد. بیشترین میزان IgA متعلق به تیمار ۱ بـود. افزایش میزان آن به مقدار ۱+۲ میلی گرم در دسی‌لیتر بسیار قابل توجه است، زیرا در پلاسمای ماهی‌ها این شـاخص یا وجود ندارد و یا مقدار بسیار ناچیزی از آن دیده می‌شود.



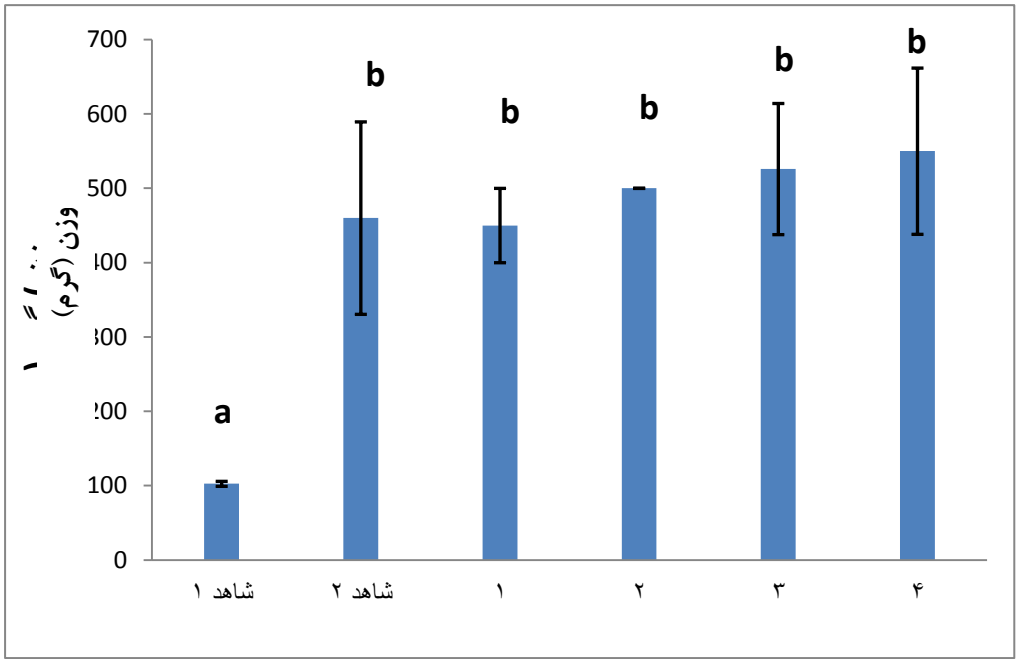

**شکل ۲ـ نمودارمیانگین تغییرات IgA وانحراف معیارهای مربوطه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای آزمایشی در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده باجلبک *Dunaliella salina* حروف متناوب، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.**
**(آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)**

نتایج حاصل از زیست سنجی (میانگین وزن و طول کل) در دوره ی ۹۰ روز آزمایش،در جدول(۳) ارائه گردیده است. نتایج نشان می‌دهد که میانگین وزن در نمونه‌های شاهد ۱ با مقدار ۳/۳۶ ± ۱۰۲/۶ گرم کمتراز میانگین وزن در نمونه‌های شاهد ۲ با مقدار ۱۲۹/۴۲ ± ۴۶۰ گرم بود. بیشترین میزان وزن در تیمار ۴ با مقدار ۱۱۱/۸ ± ۵۵۰ گرم و کمترین میزان آن در تیمار ۱ با مقدار۲/۷ ± ۴۵۰ گرم مشاهده شد. طبق این جدول میانگین طول در نمونه‌های شاهد ۱ با مقدار ۰/۳ ± ۲۰/۳۶سانتی متر کمتر از میانگین طول در نمونه‌های شاهد ۲ با مقدار ۲/۶ ± ۲۸/۴ سانتی متر بود. بیشترین میزان طول در تیمار ۴ با مقدار ۱/۲۶ ± ۳۰/۷۴ سانتی متر و کمترین میزان آن در تیمار ۱ با مقدار ۲/۰۷ ± ۲۹/۲ سانتی متر دیده شد.

**جدول ۳ـ میانگین تغییرات وزن و طول کل و شاخص وضعیت در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* در پایان دوره پرورش (۹۰ روز)**

| زمان | نمونه‌ها | میانگین | | انحراف معیار | | شاخص وضعیت ۰/۰ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | وزن (گرم) | طول کل (سانتی متر) | وزن (گرم) | طول (سانتی متر) | میانگین | انحراف معیار |
| شروع آزمایش | شاهد ۱ | ۱۰۲/۶ | ۲۰/۳۶ | ۳/۳۶ | ۰/۳۰ | ۱/۲۲ | ۰/۰۲ |
| ۳ ماه بعد | شاهد ۲ | ۴۶۰/۰ | ۲۸/۴۰ | ۱۲۹/۴۲ | ۲/۶۰ | ۱/۹۷ | ۰/۱۸ |
| | تیمار۱ | ۴۵۰/۰ | ۲۹/۲۰ | ۵۰/۰۰ | ۲/۰۷ | ۱/۸۳ | ۰/۳۵ |
| | تیمار۲ | ۵۰۰/۰ | ۳۰ /۲۰ | ۰ | ۰/۴۴ | ۱/۸۲ | ۰/۰۸ |
| | تیمار۳ | ۵۲۶/۰ | ۳۰ /۹۰ | ۸۸/۲۰ | ۱/۱۴ | ۱/۷۷ | ۰/۱۴ |
| | تیمار۴ | ۵۵۰/۰ | ۳۰/۷۴ | ۱۱۱/۸۰ | ۱/۲۶ | ۱/۸۷ | ۱/۸۷ |

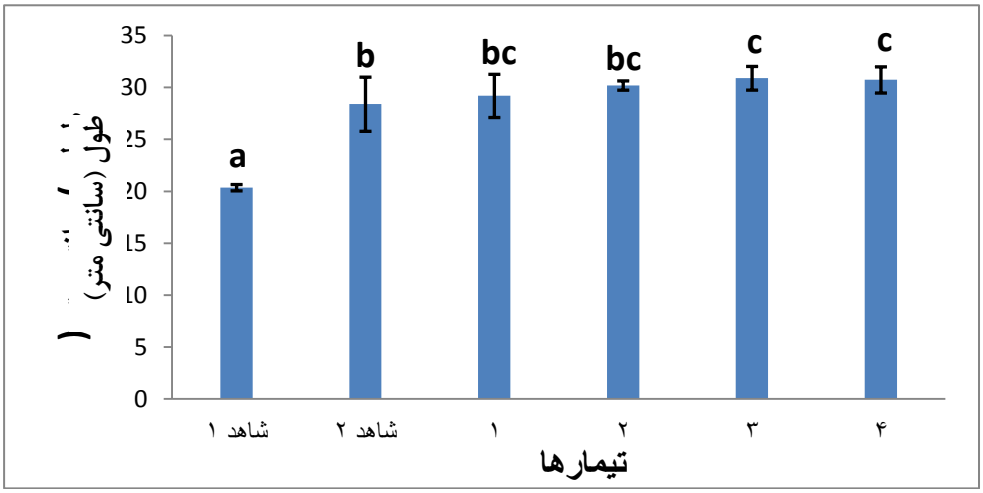
با توجه به داده‌های حاصل از فاکتور وزن و نتایج حاصل از آزمون دانکن به خوبی مشخص می‌شود، که با افـزایش میزان جلبک در جیره غذایی، رشد ماهی‌ها به یک اندازه افزایش یافته است و اختلاف آماری معنی‌داری در تیمارها و ماهیان گروه شاهد ۲ دیده نشد ($P>0.05$).




**شکل ۳ـ نمودارمیانگین وزن وانحراف معیارهای مربوطه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای آزمایشی در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* حروف متناوب، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آزمون دانکن می‌باشد.**

**(آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)**

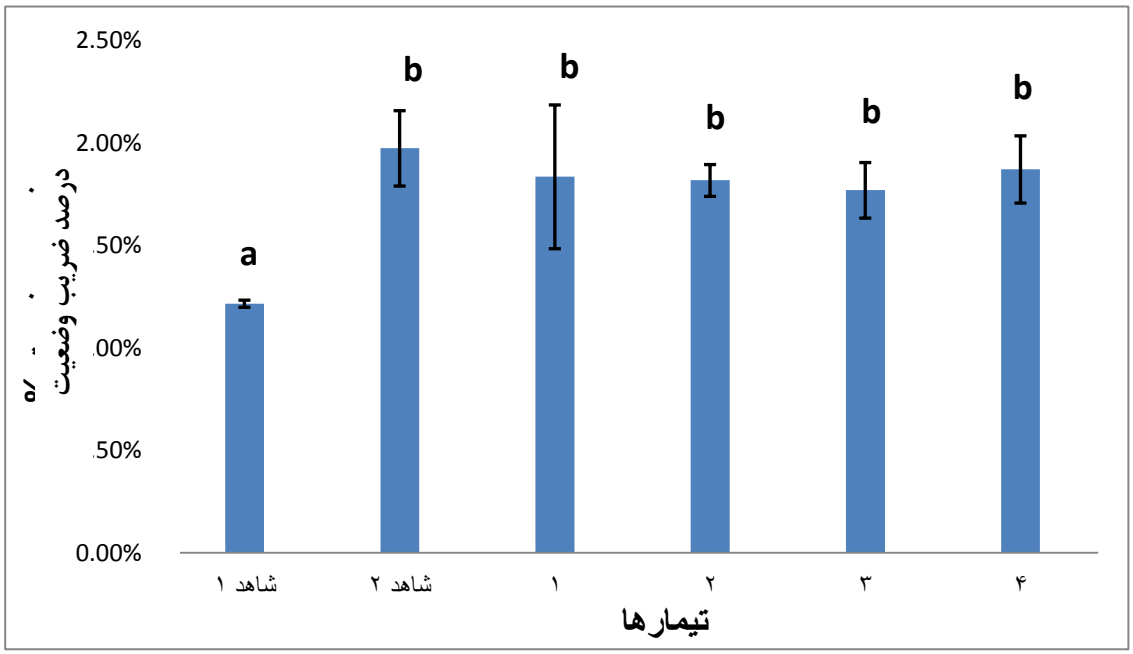
نتایج حاصل از فاکتور طول و آزمون دانکن نشان دهنده این است که طول ماهی‌های تغذیه شده با جلبـک دونـالی یـلا درمقایسه با گروه شاهد ۲ به طور معنی‌داری افزایش یافته است($P< ۰/۰۵$). به طوری که بیشترین میزان افـزایش در تیمـار ۴ و۳ مشاهده گردید. از نکات قابل توجه این است، که از نظر میزان غذای مصرفی بین تیمارها اخـتلاف آمـاری معنـی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$) ولی با افزایش مقدار جلبک در جیره غذایی طول ماهی‌ها افزایش یافت.




**شکل۴- نمودارمیانگین طول و انحراف معیارهای مربوطه در نمونه‌های شاهد تیمارهای آزمایشی ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک *D. salina* حروف متناوب، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.**

**(آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)**

نتایج حاصل از بررسی شاخص ضریب وضعیت نشان می‌دهد که رشد ماهی در تمامی تیمارها به یک اندازه افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد ۲ دیده نمی شود (P> ۰/۰۵).




**شکل ۵ـ نمودارمیانگین ضریب وضعیت و انحراف معیارهای مربوطه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای آزمایشی در ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با جلبک *D. salina* حروف متناوب، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.**
**(آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است)**

## بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان دادند، که سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgM و IgA (شکل ۱و ۲) در پلاسمای ماهی‌هایی که با جلبک *Dunaliella salina* تغذیه شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری (P< ۰/۰۵) در مقایسه با گروه شاهد ۲ می‌باشند. سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgM و IgA با افزایش مقدار جلبک و زیاد شدن وزن افزایش یافتند. سطوح ایمونوگلوبولین‌های IgG و IgE تغییری در جهت افزایش از خود نشان ندادند.

میزان IgM و IgA به ترتیب به میزان (۱ ± ۱۰) و (۱ ± ۲) میلی گرم در دسی لیتر در پلاسمای ماهی‌ها افزایش یافت. سطح IgM در پلاسمای تیمارهای آزمایشی طی دورهٔ آزمایش، دارای یک روند صعودی بود و با افزایش میزان بتا کاروتن افزایش یافت. افزایش بتاکاروتن از طریق افزایش میتوژن القایی موجب افزایش در فراوانی لنفوسیت‌ها و سلول T می‌شود(Tachibana *et al.*, 1997). افزایش میزان IgM، نشان دهندهٔ اتصال رسپتورهای Fc با IgM بوده که از طریق این رسپتورها قادر به شناسایی و هضم باکتری‌های پوشیده شده از آنتی بادی‌های IgM می‌باشند (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵).

لنفوسیت‌ها از جمله مراکز مکانیزم‌های دفاعی اختصاصی بوده و این سلول‌ها در بروز پاسخ‌های ایمنی اختصاصی اعم از سلولار و همولار نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. پاسخ‌های ایمنی همورال با واسطه لنفوسیت‌های T انجام می‌گردد. افزایش میزان ایمونوگلوبولین‌ها با افزایش وزن، نشان دهندهٔ تکامل یافتن سلول‌های خونی و اندام‌های خون ساز و در نتیجه افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است و افزایش لنفوسیت‌های T، نشان دهندهٔ پاسخ ایمنی سلولار می‌باشد. بتاکاروتن پیش ساز ویتامین A می‌باشد و از طریق القای میتوژن، موجب افزایش

لکوسیت‌ها، لنفوسیت‌های T (Daniel *et al*., 1991) و ماکروفاژهـا (بیگانـه خـواری) مـی‌شـود(Tachibana, 1984). مکمل‌های غذایی حاوی بتاکاروتن پس از دو هفته تعداد سلول‌های کمک کنندهٔ T را افزایش مـی‌دهنـد و بـر تعـداد سلول‌های T سرکوب گر تأثیری نمی‌گذارند(Alexander *et al*.,1985).

بررسی اثر مکمل غذای حاوی ویتامین A توسط Thompson و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشـان داد کـه افـزایش سطوح ویتامین A در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *(Salmo salar)* موجب افزایش فعالیت کمپلمان و لیزوزیم می‌شـود، به عبارت دیگر سطوح بالای ویتامین A باعث افزایش فعالیت سرم آنتی پروتئـاز شـده و هـم چنـین میـزان فعالیـت فاگوسیتوزی و ضد باکتریایی را افزایش می‌دهد (Thompson *et al*., 1993).

در تحقیقی که توسط Tachibana و همکاران در سـال ۱۹۹۷ گـزارش شـده اسـت، تـأثیر روتیفرهـای غنـی شـده بـا بتاکاروتن در میزان فراوانی لنفوسـیت‌هـا و درصـد بقـاء بـر روی لارو گونـه‌ای از طـوطی مـاهی ژاپنـی ( *Oplegnathus fasciatul*) و طوطی ماهی خال‌دار (*Oplegnuthus punctatas*) بررسی گردید.

در این بررسی افزایش بقای لاروی در ماهی‌های تغذیه شده با روتیفر غنی شده با بتاکاروتن در مقایسه بـا گـروه شـاهد مشاهده شد و بتاکاروتن موجود در روتیفر غنی شده موجب فراوانی در تعداد لنفوسیت‌های طحال در طـوطی مـاهی ژاپنـی و طوطی ماهی خال‌دار شد (Tachibana *et al*., 1997). در باره بررسی اثـر جلبـک دونـالی یـلا سـالینا روی شـاخص‌هـای ایمونولوژیک می‌توان به تحقیقی که توسط Amar و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام شـد، اشـاره نمـود. در ایـن بررسـی اثـر جلبک دونـالی یـلا سـالینا حـاوی رنگدانـه بتاکـاروتن و مخمـر *Phaffia rhodazyma* حـاوی رنگدانـه آسـتاگزانتین روی مکانیسم‌های حفاظتی غیر اختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمـان نشـان داد کـه رنگدانـه‌هـای کاروتنوئیـدی موجـب افزایش فعالیت کمپلمان و لیزوزیم شده و در نتیجه باعث افزایش تعداد کل لکوسیت‌ها و سلول‌های بیگانه خـوار مـی‌شـود. میزان ایمونوگلوبولین در پلاسمای ماهی‌هایی که با جلبک دونـالی یـلا تغذیـه شـده بودنـد افـزایش یافـت (Amar *et al*., 2004).

نتایج بررسی حاضر موید این موضوع است که میزان IgM و IgA در پلاسمای ماهی‌های تغذیـه شـده بـا جلبـک دونالی یلا سالینا پس از سه ماه افزایش یافت که این افزایش نشـان دهنـدهٔ خنثـی سـازی اثـر ویـروس‌هـا و قـدرت بیماری‌زایی باکتری‌ها و سموم مترشحه از آنها و فعال سازی سیستم کمپلمان از طریق مسیرهای فرعی (فعال سـازی مسیر کلاسیک کمپلمان نیازمند حضور یون کلسیم) و تسهیل در بلع ذرات است که IgM در این اعمال نقش بسـیار موثری را ایفا می‌کند (Bernstein *et al*., 1998). ایمونوگلوبولین عمده ماهیان با عمل پـادتنی باکتریـایی و ویروسـی مشابه IgMحیوانات عالی می‌باشد.بنابراین ماهیان با پادگن‌های باکتریایی و ویروسی به طور متفاوت بـا تشـکیل یـک معادل IgM واکنش نشان خواهند داد(مخیر،۱۳۸۱).

در این بررسی، شاخص‌های IgG و IgE تغییری را در جهت افزایش از خود نشـان ندادنـد و سـطوح سـرم IgE و IgG بسیار ناچیز بود. فقدان تقریبی گاماگلوبولین‌ها در سرم ماهیان مـی‌توانـد نشـان دهنـده آن باشـد کـه ماهیـان همانند مهره داران عالی تر،ایمنی پذیر نیستند. تحقیقات نشان داده انـد کـه ایمونوگلوبـولین‌هـا در ماهیـان، همگـی جزءماکروگلوبولین‌ها هستند و از طرفی، ماهیان ایمونوگلوبولین مشابه IgG جانوران عالی را نداشته یـا کمـی از آن را دارند(سلطانی،۱۳۸۷). از دلایل این موضوع می‌توان به این نکته اشاره کرد که در ماهیان ایزوتوپ مشـابه IgE وجـود نداشته و EGC نیز فاقد هیستامین است، در حالی که در پستانداران ایزوتوپ IgE به عنوان آزادسـازی هیسـتامین از سلول‌های ماست و بروز پاسخ‌های آلرژیک و التهابی عمل می‌نماید. بررسی‌های انجام شده در ماهی پـه لـیس، نشـان می‌دهد که در بروز حساسیت‌های پوستی در ماهی په لیس، پروتئین‌های واکنشی C به عنوان واسطه در دی گرانولـه کردن سلول‌های EGC عمل می‌نمایند، به همـین دلیـل ماهیـان دارای اجـزاء کمپلمـان $C_3$ و $C_5$ هسـتند کـه ایـن ترکیبات ممکن است نقش مهمی را در بروز پاسخ‌های ایمنی شناسی ماهیـان اسـتخوانی ایفـا نماینـد، زیـرا ظرفیـت

ماهیان استخوانی در پاسخ به تحریک آنتی ژن نشان داد که این ماهیان می‌توانند ماده چسبناک باکتری مشخصـی را تولید کرده و ایمن سازی برای آنتی ژن‌های متعددی را توسعه دهند. این پاسخ‌ها در دمای پایین تر سست یا خنثـی می‌شوند، به طوری که ممکن است در جانوران خونسرد قابل پیش بینی باشند.(Hoar & Randall, 1970)

توجه به نتایج حاضر نشان می‌دهد که روند تغییرات ایمونولوژیک در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در نتیجهٔ تغذیه با جلبک دونالی یلا سالینا افزایش می‌یابد. افزایش این شاخص‌ها نشان دهندهٔ این است که بتاکاروتن موجود در ایـن جلبک به شکل قابل توجهی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را تحریک نموده و باعث افزایش مقاومـت آن می‌گردد.

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی و با نظر به این که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمـان عمـده-ترین ماهی پرورشی کارگاه‌های تکثیر و پرورش در ایران اسـت، اسـتفاده از گونـه *Dunaliella salina* را در راسـتای بهره‌گیری از خواص مثبت ایمنی و فیزیولوژیک آن و با توجه به این که امکان تولیـد آن در ایـران وجـود دارد، بـرای افزایش کیفیت ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان به پرورش‌دهندگان ماهیان سردابی در ایران پیشنهاد می‌شود.

## تشکر و قدردانی

از تمام عزیزانی که در مراحل انجام این پژوهش همکاری نمودند و هم‌چنین مدیریت محتـرم و کارکنـان کارگـاه تکثیر و پرورش امام‌زاده علی و مسئول محترم آزمایشگاه تحقیقاتی تشخیص غدد، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

باقری،ک.۱۳۸۸. بررسی اثر جلبک دونالیلا بر روی تغییر رنگ گوشـت و رشـد مـاهی قـزل‌آلای رنگـین کمـان ۱۰۰ گرمی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون در یایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ایران.

دیوی، ف. و جان برنارد، ه.۱۹۹۶. خون‌شناسی، انعقاد و طـب انتقـال خـون. ترجمـه: احمـدی،ک.، م. مجتهـدزاده، و رخشان. انتشارات تیمورزاده. تهران، ایران.

سلطانی،م.۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ایران.

عسکریان، ف.و کوشا،آ.۱۳۸۵. مجموعه فیزیولوژی آبزیان (جلداول): استرس نشر علوم کشاورزی.تهران،ایران.

کلباسی، م. ۱۳۷۸. تهیه کاریو تایپ کروموزومی از جنین، لاروو fry، ماهی قـزل‌آلای رنگـین کمـان. طـرح پژوهشـی دانشگاه تربیت مدرس. نور. ایران.

مخیر،ب.۱۳۸۱.بیماری‌های ماهیان پرورشی.موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ایران.

مهرابی، ی.۱۳۷۸. مطالعه مقدماتی اثر بیهوشی پودر گل درخت میخـک (*Syzygium aromaticum*) بـر روی مـاهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله پژوهش و سازندگی۱۷ :۱۶۰-۱۶۲.

Alexander, M., Newmark, H. & Miller, R. G. 1985. Oral beta-carotene can increase the number of ok T4+cells in blood. Immunol., 9: 221-224.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. & Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Japan.

Ben-Amotz, A., A. Katz & Avron, M. 1982. Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil*. Journal of Physiology, 18: 529-537.

Bernstein, R.M., Schlutr, S.F. & Marchalonis, J.J. 1998. Immunity, In: the physiology of fishes. Evans, D.H. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA.

Daniel, L.R., Chew, B.P., Tanaka, T.S. & Tjoelker, L.W. 1991. In vitro effects of β-Carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. J. Dairy Sci., 74: 911-915.

Dunal, F. 1838. Extrait dunmemori surles algues quicolorant enrouge certains eauxdes marais salasts mediterraneens.Ann. Sc. Nat. Bot. 2 Ser., 9 : 172.

Edge, R., McGarvey, D. J, & Truscott, T. G, 1997. The carotenoid as antioxidants. A Review. Journal of Photochemistry and PhotobiologyB: Biology, 41:189-200.

Hoar,W.S. & Randall, D.J. 1970. Fish physiology. University of British Columbia. Vancouver, Canada.

Qureshi, M.A & Ali, R.A. 1996.*Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. Immunopharmacol Immunotoxicol, 18: 457-463.

Tachibana, K., Sone, S. Tsubura, E. & Kishino, Y. 1984. Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages. Br. J. Cancer, 49: 343-348.

Tachibana, K., Yagi, M., Hara, K., Mishima, T. & Suchimote, M. 1997.Effects of feeding of B-carotiene supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciotus)* and spotted parrotfish *(Oplegnathu punctatus*) : preliminary trials. Hydrobiologia, 358 :313-316.

Teodoresco, E. C. 1905. Organization et development du Dunaliella, nouveau genre de volvocacee-polyblepharilee. Beih z bot central b, Bd, X V III : 215-232.

Thomas L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. TH. Books Verlagsgesell schaft.Frankfort.

Thompson, L., Choubert, G., Houlihan, D.F. & Secombes, C.J. 1994. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture, 133: 91-102.

Tim, J., Bowden, T. J., Thompson, K.D., Morgan, A.L. & Nikoskelainen, S. 2007. Seasonal variation and immune response: A fish perspective. Department of Zoology, University of Aberdeen, Scotland, UK.

Wang, Y. J., Huchien, Y.& Hugpan, C. H. 2006. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation and antioxidant capacity of characins, (*Hyphessobry callistus).* Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University Keelung,Taiwan.

Zar, J.H.1999. Blostatistical Analysis.Prentic Hall. ($4^{th}$ Edition) New Jersey. USA.