مجله شیلات
سال سوم، شماره چهارم، تابستان ۸۸

ارزیابی اثرات زئولیت برروی برخی فاکتورهای ایمنی و آنزیمی ماهی کپور دریای مازندران (*Cyprinus arpio*)

***مهدی یوسفیان[۱]، مسعود هدایتی‌فرد[۱] و حسن صادقی‌فر[۲]**

[۱]استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر،

[۲]استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر

چکیده

در این تحقیق نقش زئولیت در بهبود شرایط محیطی و بهبود قدرت ایمنی کپور دریایی *Cyprinus carpio* انجام شد. به این منظور اثر زئولیت با میزان ۲۰، ٤٠، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر و بدون زئولیت با سه تکرار برای مدت ٦٠ روز بر رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و ایمنی ماهی مورد تحقیق قرار گرفت. ماهیان این تحقیق از مرکز تکثیر و پرورش شهید رجایی تأمین گردید. میزان درجه حرارت، هدایت الکتریکی، شوری و سختی کل برای گروه شاهد و تیمار با زئولیت در طول آزمایش تقریباً یکسان بود. میزان یون آمونیوم و آمونیاک شاهد به مراتب بسیار بیشتر از گروه تیمار بوده است. میانگین وزن نهایی (گرم) ماهیانی که در تیمار بالاتر زئولیت قرار داشتند، نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این وضعیت در خصوص سایر پارامترهای رشد نیز مشابه بوده است. دراین تحقیق بین تیمارهای زئولیت و شاهد برای میانگین مقدار آنزیم لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، کمپلمان C_3، IgM اختلاف معنی‌داری را نشان داده است. نتایج کلی تحقیق نشان داده است که زئولیت به‌میزان محسوسی آمونیاک استخر وحوضچه‌های پرورشی را کاهش داده و سبب افزایش اکسیژن و کاهش pH می‌شود. در این تحقیق با وجودی‌که بین تیمارهای زئولیت و شاهد اختلاف وزن وجود داشت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبوده است. استفاده از زئولیت بر خصوصیات فیزیولوژیکی و ایمونولوژی ماهی تأثیر داشته و ایمنی ماهیان در شرایط وجود زئولیت افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: آلکالین فسفاتاز، کمپلمان C_3، IgM، لیزوزیم، ماهی کپور دریایی.

مقدمه

دریای مازندران از مهم‌ترین دریاچه‌های طبیعی می‌باشد که دارای انواع ماهیان با ارزش اقتصادی و منحصر به فرد است. ماهی کپور دریایی از جمله مهم‌ترین ماهیان دریای مازندران محسوب می‌گردد که به‌دلیل فعالیت‌های انسانی و تغییر ساختار رودخانه‌ها ذخایر آن کاهش یافته است. به‌دلیل اهمیت ماهی کپور از بعد اقتصادی، کاهش شدید ذخایر آن و نیز کیفیت مطلوب گوشت و بازارپسندی آن، شرکت سهامی شیلات ایران نسبت به تکثیر و رهاسازی آن اقدام نموده است. بررسی‌های اولیه در خصوص این ماهی نشان داده که برخلاف ماهی کپور پرورشی در محیط محصور از سرعت رشد بالایی برخوردار نیست (٤).

در پرورش ماهی مدیریت استفاده از آب موفقیت تولید مطلوب را برای پرورش‌دهنده به همراه دارد. در بسیاری از موارد افزایش تراکم ناشی از افزایش رشد ماهی، استفاده مجدد از آب برگشتی و افزایش دما شرایط نامناسبی را برای ماهی پرورشی به‌وجود آورده و تلفات سنگین ماهی را به همراه دارد. یکی از دلایل عمده تلفات در استخرهای پرورش ماهی افزایش گازهای مضر در آب و به‌خصوص مسمومیت با آمونیاک است.

*- مسئول مکاتبه: yousefianeco@yahoo.com

به‌دلیل اهمیتی که مسمومیت بالای آمونیاک در ماهیان دارد تحقیقات زیادی در این رابطه در جهان صورت گرفته است (۱۲). هوادهی و تعویض آب از راه‌کارهای متداول کاهش آمونیاک آب است ولی در فصل تابستان که آب برای مزارع کشاورزی استفاده می‌شود، امکان تعویض آب کم می‌شود، بنابراین استفاده از مواد کاهش‌دهنده آمونیاک آب در رفع این مشکل عمومی مزارع پرورش ماهی لازم است. در این خصوص استفاده از زئولیت که کاربردهای فراوانی دارد پیشنهاد گردیده است. زئولیت می‌تواند در جابه‌جایی یون‌ها، فیلتر کردن آب و حذف گازهای مضر استفاده شود. زئولیت همچنین برای جذب یون‌های مضر آب نیز مؤثر واقع شده است.

زئولیت‌ها، بلورهای آتشفشانی هیدراته سیلیکات آلومینیوم می‌باشند که از کاتیون‌های قلیائی و قلیائی خاکی هستند و ساختمان سه‌بعدی نامحدود دارند. آنزیمیت با جذب H_2S, NH_4 که غلظت بیش از حد آن در آب برای انواع مختلف آبزیان خطرناک و کشنده می‌باشد، باعث بهبود کیفیت آب می‌شود. همچنین آنزیمیت از نوسانات pH آب جلوگیری می‌نماید. از آنجایی‌که زئولیت‌ها کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف دارند، تقاضای مصرف انواع طبیعی و مصنوعی بستگی به خواص فیزیکی و شیمیایی آنها دارد که این خواص خود نیز بستگی مستقیم به ترکیب شیمیایی و ساختمان بلوری آنها دارد (۱۹).

استفاده از فیلترهای زئولیتی در سیستم پرورش ماهی می‌تواند جایگزین فیلترهای بیولوژیک گردد. همچنین در سیستم پرورش مدار بسته برای کاهش آمونیوم می‌توان از کلینوپتیلولیت به همان روش فیلتراسیون استفاده کرد (٦).

براساس برخی مطالعات زئولیت دارای تأثیر مثبتی برروی بقاء، رشد و افزایش ایمنی ماهیان می‌شود (۱ و ۵). زئولیت در پرورش ماهی برای تسهیل تجزیه باکتریایی باقی‌مانده مواد غذایی و تبدیل آمونیوم به نیتریت و نیترات مؤثر است (١٦).

علاوه‌بر زئولیت طبیعی که در طبیعت وجود دارد، امکان تهیه زئولیت مصنوعی نیز وجود دارد و در سال‌های اخیر به‌دلیل کاربردهای وسیعی که زئولیت پیدا نموده است، نسبت به تولید زئولیت مصنوعی نیز اقدام شده است. در تهیه زئولیت مصنوعی می‌توان مواد، خلل و فرج و کانال‌های زئولیت را انتخاب و برای تبادل یونی ویژه استانداردسازی نمود (۱۵).

در تحقیق حاضر تأثیر زئولیت بر برخی از شاخص‌های رشد و نیز شاخص‌های فیزیولوژیکی و ایمنی در بچه‌ماهی کپور دریایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مقدمات اجرای این طرح از بهار سال ۱۳۸۷ در مرکز آبزی‌پروری ساری انجام گرفت. ابتدا نسبت به تهیه بچه‌ماهی به تعداد ۱۰۰۰ قطعه با وزن متوسط ۱۳ گرم اقدام شد. پس از عادت‌دهی ماهیان به محیط جدید آزمایش اصلی به‌مدت ٦٠ روز شروع گردید. وزن ماهیان پس از عادت‌پذیری در بیومتری اولیه انجام شده ۲۲ گرم بوده است. تراکم ماهیان به تعداد ۲۰ عدد ماهی در هر مترمربع استخر در نظر گرفته شد.

آزمایش در یک طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت. تیمارهای آزمایش بیهوشی ماهیان با استفاده از MS222 به نسبت به‌ترتیب A، B، C و D با نسبت ۲۰، ٤٠، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم زئولیت در هر لیتر آب استخر انجام شد. هر تیمار با سه تکرار و یک گروه شاهد (E) با سه تیمار در نظر گرفته شد که مجموعاً ۱۵ حوضچه فایبرگلاس برای آزمایش اختصاص یافت.

اندازه‌گیری وزن و طول ماهی هر ۱۵ روز یک‌بار انجام می‌شد. به این منظور، ابتدا ماهیان را در یک سطل آب بی‌هوش نموده و سپس نسبت به اندازه‌گیری طول استاندارد و وزن ماهی با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اقدام گردید و میانگین وزنی ماهی‌های تیمارهای مختلف محاسبه گردید.

صفات مورد بررسی شامل تعیین افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی و بررسی شاخص‌های رشد بر اساس متد Kissil و همکاران (۲۰۰۱) بوده است. علاوه‌بر آن آنزیم‌های لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، کمپلمان C_3 و C_4 و نیز IgM نیز اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق از کیت‌های پارس آزمون استفاده گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌عنوان یکی از شاخص‌های ایمنی ذاتی با استفاده از سرم خون و روش جذب نوری به همراه سنجش کدورت صورت پذیرفت. Fast و همکاران (۲۰۰۲) از روش (Kinetic) به‌منظور تعیین مقادیر آلکالین فسفاتاز استفاده نمودند (۱۱). برای اندازه‌گیری کمپلمان C_3 و C_4، در این آزمایش C_3 و C_4 با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌گردد. میزان کدورت ایجاد شده با مقدار C_3 و C_4 رابطه مستقیم دارد (۱٤ و ۲۲).

IgM نیز همانند کمپلمان‌ها با آنتی‌بادهای پلی‌کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شود. میزان کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم دارد (۹). در این تحقیق از دستگاه اتولایزر (Eurolyser) ساخت شرکت هوشمند فناور تهران استفاده گردید.

آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی آب

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب رودخانه تجن: آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی آب با بهره‌گیری از روش‌های متداول Standard Method تألیف Clescert و همکاران (۱۹۸۹) انجام شده است. خصوصیات فیزیکوشیمیایی مورد بررسی شامل اندازه‌گیری اکسیژن، هدایت الکتریکی، pH، NH_4، NH_3، H_2S، NO_3، NO_2 سختی کل، شوری و درجه حرارت آب بوده است.

روش تحقیق (مدل آماری آزمایش): برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و از تست آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون Duncan استفاده شده و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد (P=۰/۰۵) تعیین گردید.

نتایج

همان‌طور که در قسمت مواد و روش‌ها اشاره شد بچه‌ماهیان انگشت‌قد کپور وحشی به ۱۵ حوضچه فایرگلاس رهاسازی شدند پس از یک هفته دوره آداپتاسیون استفاده از زئولیت با اضافه نمودن به آب آغاز شد، در این تحقیق تیمارهای A، B، C، D، E به‌ترتیب با دوز ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر و تیمار E بدون استفاده از زئولیت (شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی شاخص‌های رشد در پایان دوره و فاکتورهای فیزیولوژیکی و ایمنی در دو مرحله ۳۰ و ٦۰ روز بعد از آغاز تغذیه صورت گرفت.

تأثیر استفاده از زئولیت بر میانگین افزایش وزن: نتایج پرورش دو ماهه بچه‌ماهیان کپور (جدول ۱) تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی از نظر وزن انتهایی، افزایش وزن، درصد بازماندگی و میزان رشد ویژه نشان نداد (P>۰/۰۵)، ولی ماهیان تیمار با زئولیت و به‌خصوص در تیمارهای ۸۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر زئولیت افزایش و ضریب رشد بیشتری نسبت به شاهد بودند.

تأثیر استفاده از زئولیت بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب: دو هفته پس از رهاسازی بچه‌ماهیان براساس میزان تیمارهای ۲۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم زئولیت به استخر اضافه شد و ۲٤ ساعت پس از آن نمونه‌برداری از استخرهای تیمار و استخر شاهد در تاریخ ۸۷/۵/۱٤ انجام گرفت. بررسی تأثیر شیمیایی زئولیت در آب در شرایط کارگاهی در ونیرو در هفته اول نمونه‌برداری در جدول ۲ نشان داده است. مراحل بعدی نمونه‌برداری که در مقاله مستقلی ارائه شده همین وضعیت را نشان می‌دهد.

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد (M±SD) بچه‌ماهی کپور دریایی پرورش‌یافته در مقادیر مختلف آنزیمیت

تیمار	وزن اولیه	افزایش وزن	درصد افزایش وزن	ضریب رشد ویژه SGR	درصد بازماندگی SQ
A	۱۳/٦٤±۲/۳	۸/٤۲±۰/٦٥	٦۱/۷۳±۳/۷	۰/۸۰±۰/۰۲	۹۱/۷±۱/۳
B	۱۳/۸٤±۱/٤	۹/۱۳±۰/۵۲	٦۲/۹۷±٤/۵	۰/۸٤±۰/۰۱	۹۵/۳۰±۱/۳
C	۱۲/۷۹±۰/۹	۱۰/٦۷±۰/۷۳	۸۳/٤۲±۳/۳	۱/۰۱±۰/۰۳	۹٤/۲۰±۲/۵
D	۱۳/۵۵±۰/۷	۱۰/۳۰±۰/٦	۷٦/۰۱±۵/٤	۰/۹٤±۰/۰۲	۹٦/۰۷±۳/٤
E	۱۳/٦۹±۱/۸	۸/۱٤±۰/۷	۵۹/٤٦±٦/۱	۰/۷۸±۰/۰۳	۹۳/۷±۲/۵

جدول ۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در مقابل نسبت‌های مختلف زئولیت در فایبرگلاس

گروه	تکرار	درجه حرارت	اکسیژن mg/l	هدایت الکتریکی ms/cm	TDS g/l	pH	سختی کل mg/l	شوری (درصد)	$NO_{-۲}$	$NH_{+٤}$	$NH_۳$	$NO_{-۳}$	$H_۲S$ mg/l
									mg/l				
A	۳	۲۸	۷	۱۷/۳۷	۸/٦۸	۸/۱٤	۳۸۰۰	۱۱/۲۹	۰/۰۰٤	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲۰	۰/۱۲	۰/۰۳۲
B	۳	۲۸	۷	۱۷/۳	۸/۷	۸	٤۰۰۰	۱۱/۳	۰/۰۰٤	۰/۰۹۳	۰/۰۰۷۹	۰/۰۹۷	۰/۰۳
C	۳	۲۸	۷/۷	۱۷/۳۹	۸/٦۹	۸/۸	٤۲۰۰	۱۱/۳۱	۰/۰۰۲	۰/۰۸۲	۰/۰۰۷٦	۰/۱۰۵	۰/۰٤۲
D	۳	۲۸	۷/٤	۱۷/۳۹	۸/٦۹	۸/۱۷	۳۵۰۰	۱۱/۳۱	۰/۰۰۱	۰/۰۷۲	۰/۰۰٦۵	۰/۰۸٦	۰/۰۳۲
E	۳	۲۸	۵/۹	۱۷/٤۰	۸/۷	۸/۰۹	۳۳۰۰	۱۱/۳۳	۰/۰۳۸	۰/۱۲۸	۰/۰۱۱	۰/۰۸۹	۰/۰۵۳

متوسط درجه حرارت در زمان اول نمونه‌برداری ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است. در تمامی تیمارها و گروه شاهد هدایت الکتریکی در دامنه بسیار کم ۱۷/٤-۱۷/۳ و شوری با اختلاف بسیار جزئی ۱۱/۳۳-۱۱/۲۹ قرار داشت. سختی کل با تفاوت ۱۳ درصدی در تیمار C نسبت به شاهد اندازه‌گیری گردید.

میزان یون آمونیوم و آمونیاک شاهد به مراتب بسیار بیشتر از گروه‌های تیمار و اکسیژن در تیمار C و D به‌میزان ۳۰ درصد بیشتر از شاهد نشان داده است. در مجموع در میان کلیه پارامترهای اندازه‌گیری شده میزان آمونیوم و آمونیاک در شاهد بیشتر از تیمارها و میزان اکسیژن آن کمتر بوده است. هر چند که این اختلاف بین تیمارهای زئولیت و شاهد معنی‌دار نیست، ولی تأثیر وجود زئولیت در استخر را نشان می‌دهد.

تأثیر زئولیت بر فعالیت‌های آنزیمی

اندازه‌گیری آنزیم لیزوزیم: با توجه به جدول ۳ بیشترین میانگین آنزیم لیزوزیم در انتهای دوره مربوط به تیمار C (٤/۸۸ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) می‌باشد که مقدار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر زئولیت مصرف نموده و تیمار شاهد با مقدار لیزوزیم ۲/٦ قرار دارد.

جدول ۳- میانگین مقدار آنزیم لیزوزیم (میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بچه‌ماهی کپور وحشی در تیمارهای مختلف در انتهای دوره مصرف زئولیت

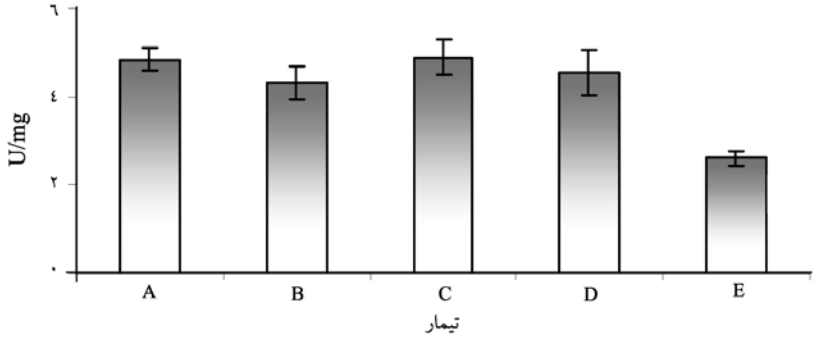
تیمار	مقدار	لیزوزیم (±SD)
A	۲۰ میلی‌گرم در لیتر	٤/۸۵±۰/۲٤*
B	٤۰ میلی‌گرم در لیتر	٤/۳۳±۰/۳۷*
C	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	٤/۸۸±۰/٤۲*
D	۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر	٤/۵۵±۰/۲۵*
E	شاهد یا کنترل	۲/٦±۰/۱٦

مطالعات آماری حاکی‌از اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای A، B، C، D با تیمار شاهد در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد ($P<۰/۰۵$) می‌باشد. این مطالعات عدم اختلاف آماری در سطح ۵ درصد را بین تیمارهای A، B، C و D نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$). با توجه به جدول ۳ در اثر استفاده از زئولیت میزان لیزوزیم در سرم خون ماهی بالا می‌رود و در دوز ۸۰ میلی‌گرم در لیتر در حد بالاتری قرار دارد (شکل ۱). آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز داخل موکوس قرار دارند و نقش مهمی را در ایمنی ذاتی ایفاء می‌نمایند.

اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز: میزان فعالیت این آنزیم دو بار در طی دوره پرورش اندازه‌گیری شد.

میانگین مقدار آلکالین فسفاتاز یک ماه پس از آغاز پرورش در محیط زئولیت اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و با شاهد نشان نمی‌دهد ($P>۰/۰۵$)، ولی دو ماه پس از آغاز پرورش بین تیمار C با شاهد اختلاف دارد ($P<۰/۰۵$).

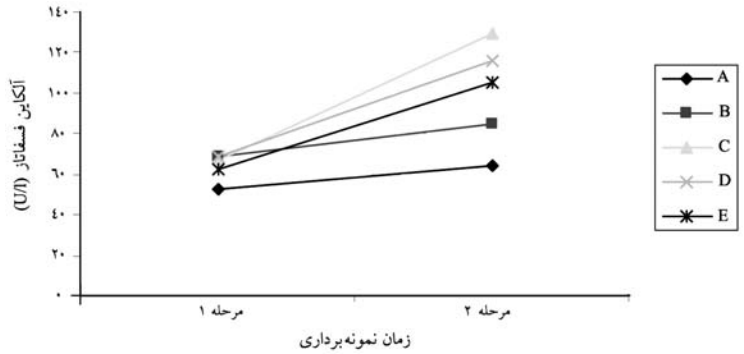
در نتیجه زئولیت موجب افزایش آلکاین فسفاتاز در گروه تیمار ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بوده است (شکل ۲).



شکل ۱- نمودار میانگین مقدار آنزیم لیزوزیم در بچه‌ماهی کپور دریای مازندران

جدول ٤- میانگین مقدار آنزیم آلکاین فسفاتاز (µ/L) بچه‌ماهیان کپور وحشی تیمارهای مختلف

تیمار	مقدار	ALP مرحله اول	ALP´ مرحله دوم
A	۲۰ میلی‌گرم در لیتر	۵۲/۷±۳/٤	٦۳/۸±۱۲/۷
B	٤۰ میلی‌گرم در لیتر	٦۸/۵±۱/۳	۸٤/۷±۱٦/٤
C	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	٦۷/۳±۱٤/۲	۱۲۹±۳۰/۷۵*
D	۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر	٦۸/۷±۱۱/۵	۱۱٦/٦±۱۲/۷
E	شاهد یا کنترل	٦۲/۲۰±٤/۳	۱۰۵/۱٦±۱۸/۵۸



شکل ۲- نمودار تغییرات آلکالین فسفاتاز در سرم ماهی کپور دریای مازندران

اندازه‌گیری مقدار C_3: میزان فعالیت کمپلمان C_3 دو بار در طی دوره پرورش اندازه‌گیری شد.

میانگین مقدار کمپلمان C_3 یک ماه پس از آغاز استفاده از زئولیت اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و با شاهد در سطح خطای ۵ درصد نشان نمی‌دهد ($P>0/05$) ولی دو ماه پس از آغاز پرورش مطالعات آماری حاکی از اختلاف معنی‌دار تیمار C و D نسبت به سایر تیمارها و به‌خصوص نسبت به شاهد در سطح خطای ۵ درصد بوده است ($P<0/05$).

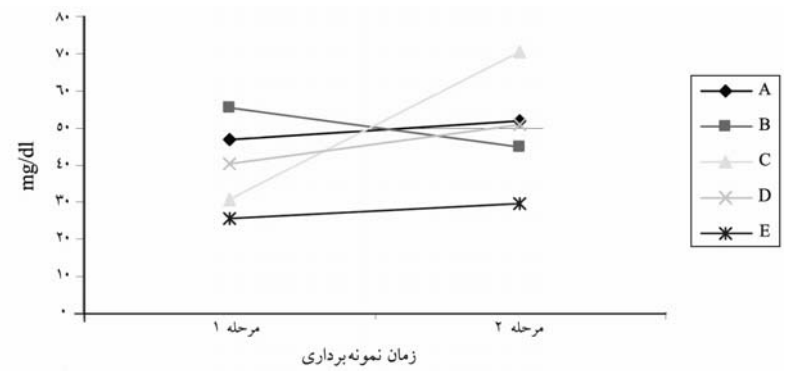
نتایج دو ماه بررسی اثر زئولیت حاکی از تأثیر مثبت زئولیت با دو دوز ۸۰ میلی‌گرم در لیتر میزان C_3 در مرحله دوم نمونه‌برداری بوده است (شکل ۳).

اندازه‌گیری مقدار C_4: میزان فعالیت کمپلمان C_4 دو بار در طی دوره پرورش اندازه‌گیری شد.

میانگین مقدار کمپلمان C_4 در هر دو بار نمونه‌برداری، یک ماه و دو ماه پس از آغاز استفاده از زئولیت اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و با شاهد در سطح خطای ۵ درصد نشان نمی‌دهد ($P>0/05$).

جدول ۵- میانگین مقدار C_3 (mg/dl) بچه‌ماهیان کپور وحشی در مرحله اول و دوم نمونه‌برداری

تیمار	مقدار	C_3 مرحله اول	C_3 مرحله دوم
A	۲۰ میلی‌گرم در لیتر	٤٦/٨±٢/١٠	٥١/٦±٢/٧
B	٤٠ میلی‌گرم در لیتر	٥٥/٤±٢/٧	٤٥±٤/٢
C	٨٠ میلی‌گرم در لیتر	٣٠/٧±٣/٤	٧٠/٤±٥/٩*
D	١٢٠ میلی‌گرم در لیتر	٤٠/٣±٣/٢	٥٠/٧±٥/٣*
E	شاهد یا کنترل	٢٥/٤٦±٣/٧	٢٩/٥٧±٤/٦



شکل ۳- نمودار تغییرات کمپلمان C_3 در سرم ماهی کپور دریای مازندران

جدول ٦- میانگین مقدار C_4 (mg/dl) بچه‌ماهیان کپور وحشی در مرحله اول و دوم نمونه‌برداری

تیمار	مقدار	C_4 مرحله اول	C_4 مرحله دوم
A	۲۰ میلی‌گرم در لیتر	١٣/٢±١/٣٢	٢٢/١±٤/٣
B	٤٠ میلی‌گرم در لیتر	١٣/٨±١/١٨	٢٣±٤/٥
C	٨٠ میلی‌گرم در لیتر	١٠/٥±٢/٧	٢٠/٨±٣/٤
D	١٢٠ میلی‌گرم در لیتر	١٢/٤±٠/٩	٢٣/٩±٣/١
E	شاهد یا کنترل	١٢/٨٦±١/٣١	٢٢/٩٦±٣/٥

نتایج دو ماه بررسی اثر زئولیت حاکی از تـأثیر مثبـت زئولیت بـا دو دوز ۱۲۰ میلـی‌گـرم در لیتـر میـزان C_4 در مرحله دوم نمونه‌برداری بوده است (شکل ٤).

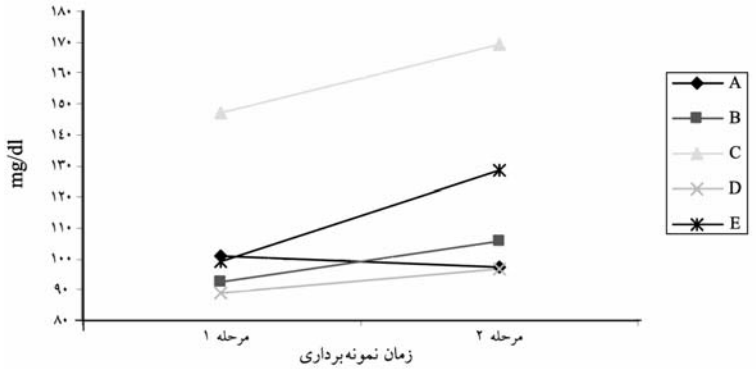
انـدازه‌گیـری مقـدار IgM: میـزان IgM در تیمارهـای مختلف و در تیمار شاهد در جدول ۷ ارائه شده است.

نتایج نشان می‌دهـد کـه میـزان IgM در مرحلـه دوم نمونه‌برداری به‌طورکلی بیشتر از مرحله اول بوده اسـت و در تیمار C میزان آن نسبت بـه بقیـه و نـسبت بـه شـاهد بیشتر بوده اسـت (شـکل ۵). مطالعـات آمـاری حـاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمـار C بـا سـایر تیمارهـا و شاهد می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

شکل ٤- نمودار تغییرات کمپلمان C_4 در سرم ماهی کپور دریای مازندران

جدول ۷- میانگین نمونه‌برداری میانگین IgM (mg/dl) بچه‌ماهیان کپور وحشی در مرحله اول و دوم نمونه‌برداری

تیمار	مقدار	IgM مرحله اول	IgM مرحله دوم
A	۲۰ میلی‌گرم در لیتر	۱۰۱±۱۱/۷	۹۷/۵±۳/۹
B	٤۰ میلی‌گرم در لیتر	۹۲/۵±٤/۷	۱۰٦±۷/٦
C	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۱٤۷/۳±۹/۳*	۱٦۹/۳±۹/۸*
D	۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر	۸۸/۹±۷/٦	۹٦/٦±۷/۵
E	شاهد یا کنترل	۹۹/۳۳±۱۸/۵۷	۱۲۸/۲۲±۸/۰۲



شکل ۵- نمودار تغییرات IgM در سرم ماهی کپور دریای مازندران

بحث و نتیجه‌گیری

زئولیـت‌هـا بلورهـای سـیلیکات آلومینیـوم هیدراتـه می‌باشند که دارای کاتیون‌هایی از خانواده فلزات هستند از ویژگی‌های این ترکیبات دارا بودن قابلیـت برگـشت‌پـذیر جذب و دفع آب و کاتیون‌ها می‌باشند.

در تحقیق حاضر تأثیر زئولیت بر رشد و بازمانـدگی و تحریک سیستم ایمنی بچه‌ماهی کپور دریایی مورد مطالعـه قرار گرفت. در بررسی حاضر افزودن زئولیت بـیش از ۸۰ میلی‌گرم در لیتر منجـر بـه افـزایش وزن در گـروه تیمـار نسبت به شاهد شده است. در تحقیقی که توسـط بیژنـگ

در شرایط استخر و برروی ماهیان گرم آبی انجام گرفته است، افزایش تولید به مقدار ۸۸٦/۵ کیلوگرم در هکتار در استخرهای دارای زئولیت به‌دست آمد (۲).

ایجاد شرایط مناسب محیطی ضمن تأثیر برروی پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ماهیان سبب بهبود جذب مواد غذایی و افزایش سرعت رشد ماهیان می‌گردد.

از جمله مکانیسم‌هایی که منجربه افزایش روند رشد در ماهیان می‌شود، افزایش آنزیم‌های گوارشی است. به این منظور در این تحقیق آنزیم روده‌ای الکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شد. آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که دارای انواع روده‌ای، استخوانی و کبدی است و نوع روده‌ای آن از بافت داخل روده‌ها ترشح می‌گردد. میزان این آنزیم در روده بیانگر وضعیت فعالیت روده می‌باشد (۲۱).

مطالعات انجام شده توسط برخی محققان حاکی از این مطلب می‌باشد که میزان تغییرات سطح الکالین فسفاتاز تحت‌تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند وضعیت شیمیایی آب میزان جذب غذا، مصرف و نوع غذا، دما و سن ماهی و به‌علاوه ترکیبات موجود در جیره غذایی بویژه، فسفر می‌باشد (۲۱). میزان این آنزیم در تیارهای ۸۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم زئولیت در هر لیتر، بیش از سایر تیمارها و نیز تیمار شاهد بوده است.

یکی از فاکتورهای مورد بررسی به‌منظور دست‌یابی به شرایط سیستم ایمنی، فاکتور لیزوزیم می‌باشد. اگرچه لیزوزیم یکی از صدها فاکتور قابل بررسی جهت ارزیابی وضعیت سلامت آبزیان در جهت ایمنی ذاتی محسوب می‌شود اما در سال‌های اخیر میزان لیزوزیم موجود در خون و بافت نیز فاکتوری مناسب جهت ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس‌زا محسوب شده و در ماهیان بسیار فعال‌تر از مهره‌داران عالی‌تر است (۱۰). لیزوزیم قادر به شکستن باندهای گلیکوسیدیک موجود در لایه پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها بوده و در نتیجه منجر به مرگ پرتوپلاست می‌گردد. به‌عبارتی دیگر پلیمرهای کمپلکس اسیدهای آمینه و قندهای موجود در دیواره سلولی را هیدرولیز می‌نماید (۷).

برخی از باکتری‌ها قادرند به‌طور مستقیم به‌وسیله لیزوزیم لیز شوند، اما در بسیاری موارد غشای سلولی باکتری‌ها ابتدا مورد حمله کمپلمان واقع شده تا لیزوزیم اثرات خود را القا نماید (۸).

در آزمایش حاضر میزان لیزوزیم سرم خون بچه‌ماهیان در انتهای دوره مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان لیزوزیم متعلق به تیمارهای ۱۲۰-۸۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. نتایج آماری بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای زئولیت و شاهد را نشان می‌دهد. با توجه به این موضوع که مقادیر آنزیم لیزوزیم به‌ویژه، در سرم خون منعکس‌کننده فعالیت منوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های فاگوسیتوزکننده می‌باشند (۱۸).

بنابراین به‌طور مستقیم می‌توان تقویت سیستم ایمنی در کپور وحشی را در نتیجه افزایش این آنزیم در تیمارهای مربوط به زئولیت دانست.

علاوه‌بر لیزوزیم اندازه‌گیری میزان کمپلمان نیز در گروه‌های آزمایشی تغییرات سیستم ایمنی ماهی را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر بیشترین میزان C_4 و C_3 در مرحله اول نمونه‌برداری در هر دو فاکتور مربوط به تیمار B بوده است، ولی در مرحله دوم نمونه‌برداری برای فاکتورهای C و D بوده است.

در مقایسه فاکتور C_3 در هر دو مرحله نمونه‌برداری بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد که نشانه تأثیر مثبت شرایط محیطی بر فاکتور کمپلمان می‌باشد. این نتیجه‌گیری در تحقیقات مختلف نیز ثابت شده است، Pirarat و همکاران (۲۰۰٦) نیز بیان داشتند شرایط زیست‌محیطی، تغذیه‌ای و تفاوت‌های فردی و گونه‌ای بر روی مقادیر این آنزیم مؤثر می‌باشد.

در تحقیق حاضر علاوه‌بر بررسی ایمنی ذاتی، IgM به‌عنوان فاکتوری از ایمنی اختصاصی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نقش‌های حفاظتی آنتی‌بادی‌ها شامل خنثی‌سازی ویروسی، کشتن و چسبیدن به باکتری‌ها،

فعالیت سیستم کمپلمان و تسهیل نمودن بلع پاتوژن‌ها می‌شود. ماهیان استخوانی قادر به فراخواندن آنتی‌بادی هموارل اختصاصی مؤثر در برابر آنتی‌ژن‌های مختلف می‌باشند. شدت این پاسخ در بین گونه‌های مختلف استخوانی و در شرایط مختلف محیطی متفاوت می‌باشد. علاوه‌بر پاسخ ایمنی اختصاصی، سطوح نسبی آنتی‌بادی‌های طبیعی در سرم اغلب ماهیان دیده شده است (۱۷).

حداکثر سطوح IgM در هردو دوره نمونه‌برداری به‌ترتیب متعلق به تیمارهای C بوده است که اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان داده است ($P<۰/۰۵$). این نتیجه نشان‌دهنده تأثیر مثبت زئولیت بر میزان IgM سرم می‌باشد.

در بررسی آنزیم‌های سرمی به‌جز C_4 در مقادیر دیگر آنزیم‌ها تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف مشاهده گردید. آنزیم‌های IgM و C_3 و ALP از جمله آنزیم‌هایی هستند که به‌طور معمول در تشخیص بیماری‌ها و سلامت ماهیان به‌کار برده می‌شوند.

آنزیم‌ها سرمی به‌طور عمده تحت‌تأثیر فاکتورهای فیزیولوژیکی و محیطی قرار دارند. برای مثال نوع جیره غذایی، دمای محیط، سن ماهی و شوری در میزان آنزیم‌های سرمی و فعالیت آنها مؤثر است (۲۰).

در تحقیق حاضر هر چند که وجود زئولیت در بسیاری از موارد سبب افزایش معنی‌دار بین تیمارهای مختلف نشد، و این امر به اثبات نرسید، ولی اثر آن در ایجاد شرایط بهینه برای پرورش ماهی کپور با نتایج به‌دست آمده در سایر آزمایش‌های آنزیمی و رویارویی به اثبات رسید.

منابع

۱- پیغان، رحیم.، ۱۳۷۸. بررسی مسمومیت تجربی حاد با آمونیاک در ماهی کپور معمولی، براساس تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیم‌های سرمی، و امکان پیش‌گیری آن با زئولیت. پایان‌نامه دکترای تخصص بهداشت و بیماری‌های آبزیان. دانشگاه دامپزشکی، دانشگاه تهران.

۲- بیژنگ، ع.ر.، ۱۳۷۸. نقش زئولیت در پرورش ماهیان گرم آبی با تأکید بر تغییرات کمی فسفر در آب. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان.

۳- فغانی، ط.، ۱۳۸۵. اثر ارگوسان و واکسن بر فاکتورهای رشد، بازماندگی، تحریک سیستم ایمنی و رویارویی با باکتری استرپتوکوک در قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ۱۱۱صفحه.

٤- شیلات ایران، ۱۳۸٦. سال‌نامه آماری شیلات ایران، دفتر طرح و توسعه، سازمان شیلات ایران، تهران.

۵- یوسفیان، م.، ۱۳۸۷. بررسی کارایی زئولیت در بهبود کیفیت فیزیکی و شیمیایی آب استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم‌شهر، ۹۷ صفحه.

6.Bowman, R.S., Li, Z., Roy, S.J., Burt, T., Johnson, T.L. and Johnson, I.L., 2001. Pilot test of a surfactant-modified zeolite permeable barrier for groundwater remediation. In: Smith, J.A., Burns, S. (Eds.), Physical and Chemical Remediation of Contaminated Aquifers. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 161-185.

7.Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A. and Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comp. Biochem. Physiol. 132 (A), 645-657.

8.Fevolden, S., Roed, K.H. and Fjalested, K.T., 2002, selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture. 205, 61-75.

9.Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M., 1999. Textbook of clinical chemistry. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.K., es itrs. Tietz Textbook of clinical chemistry 3 ed Philadelphia: W.B. Saunders company, 507p.

10.Kim, D.H. and Austin, B., 2006. Innate immine responses in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) induced by probiotics. Fish shellfish Immunology, xx, pp.1-12.

11.Klin, Z., 1972. Biochem. 10, 182p.

12.Knoph, M.B., 1992. Acute toxicity of ammonia to atlantic salmon, Salmo salar, parr. Comparative Biochemistry and Physiology. 101(2), 275-282.

13.Kissil, G.W., Lupatsch, I., Elizur, A. and Zohar, Y., 2001. Long photoperiod delayed spawing and increased samotic growth in gilthed seabream (sparus aurata). Aquacalture. 200, 363-379.
14.Labor, T., 1998. In Clinical Laboratory Diagnistics, use and assessment of Clinical Laboratory Results, Edition, 696p.
15.Lo´pez-Ruiz, J.L., 1999. Zeolites in aquacultural primary production. In: Misaelides, P., *et al.*, (Ed.), Natural Microporous Materials in Environmental Technology. Kluwer Academic Publishing, Netherlands, pp. 319-326.
16.Lo´pez-Ruiz, J.L. and Go´mez, M.E.G., 1994. Marine nitrogen transformations. Aquac. Eng., 13, 147-152.
17.Magnadottir, B., 1998. Compsrison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. BuvisinDi Icelandic Agricultural Sciences, 12, 47-59.
18.Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M. and End, M., 2006. Protective effevts and meshani sms of a probiotic bacterium Lactobscillus rhamnosus against, experimental Edwardsiella tarda in tilapia (Oreochromis niloticus). Veterinary immunology and Immuniputhology. 113, 339-347.
19.Pond, W.G. and Mumpton, F.A., 1984. Zeo-Agriculture: Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture. International committee on Natural Zeolites, Brockport, New York.
20.Sauer, D.M. and Heidar, G., 1979. Enzyme activities in the plasma of rainbow trout, Salmo gairdneri, Richardson: The effect of nutritional status and salinity. Jornal of fish biology. 14, 407-412.
21.Sknoberg, D.I., Yogev, L., Hardy, R.W. and Dong, F.M., 1997. Metabolic response to dietary phosphorus intake in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 157, 11-24.
22.Whicher, J., 1996. Complement Component C Foundation for Blood. Research. 10, 1-7.

Evaluation of Zeolit effects on some immunity and enzymatic factors of Mazandran common carp (*Cyprinus carpio*)

M. Yousefian[1], M. Hedayatifard[1] and H. Sadegifar[2]

[1]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, College of Agriculture, Islamic Azad University, Ghaemshahre Branch,
[2]Assistant Prof., Dept. of Chemistry, College of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ghaemshahre Branch

Abstract

In the present study the rule of zeolit in improving environmental condition and immune potency of Mazandaran common carp (*Cyprinus carpio*) have investigated. For this propose the effect of zeolit with the range of 20, 40, 80 and 120 mg/l for 60 days in a completely randomized design in 3 replicate have investigated and compared with the control in growth and some physical and immune system of common carp. The fish of this research were obtained from propagation and culture fish of S. Rajaeii. Temperature, EC, Salinity, Total hardness was the same in treatment groups and control while the ion of Ammonium and Ammoniac was higher in control. The final weight (gr) of fish in treatment growth was not significantly higher than control. This situation in other parameter of growth factor was the same. In this study between zeolit treatment and control for the mean of lysozyme, Alkaline phosphatase, C3 complement, IgM, were significantly different ($P<0.05$). The results of the research showed that zeolit had reduced the Ammoniac and pH and increased the oxygen of the pond. In spite of the presence of difference in weight of fish in treatment and control but this difference was not significant. The use of zeolit had the effect in physiological and immunological characterestics of fish and increased the immune response in zeolity presence condition.

Keywords: Alkaline phosphatase; C3 complement; IgM; lysozyme; Mazandran Common carp.

*- Corresponding Author; Email: yousefianeco@yahoo.com