

تعیین کمترین غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش انتشار دیسک در موکوس اپیدرم ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) تغذیه شده با سطوح متفاوت ویتامین C

*زهرا روستا^۱، عبدالمجید حاجی مرادلو^۱ و رسول قربانی^۱

^۱گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۲۱

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین کمترین غلظت بازدارنده رشد (MIC) در موکوس اپیدرم بچه ماهیان کلمه تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C بود. بدین منظور، ۶۶۰ قطعه بچه ماهی کلمه با وزن متوسط $1/4 \pm 0/02$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش سیجوال بندرترکمن تهیه و پس از طی حدود ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به تعداد ۵۵ قطعه و به صورت تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در ۱۲ تانک توزیع شدند. ویتامین C با دوزهای ۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم جیره به غذا اضافه شد. در پایان دوره ۶۰ روزه پرورش، برای تعیین غلظت، موکوس به صورت مستقیم با آب مقطر رقیق گردید که غلظت های حاصله شامل ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکرولیتر در میلی لیتر بود و در برابر باکتری های گرم مثبت استرپتوکوکوس فاسیوم *Streptococcus faecium*، میکروکوکوس لوتسوس *Micrococcus luteus* و باکتری های گرم منفی *Serratia marcescens* و اشریشیا کلی *Escherichia coli* قرار گرفت. نتایج به روش انتشار دیسک و با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد نشان داد که غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر در برابر هر دو نوع باکتری دارای حداقل خاصیت ضدباکتریایی بود و با رقیق شدن موکوس فعالیت ضدباکتریایی آن کاهش یافت. تیمارهای تغذیه شده با ویتامین C قطر هاله عدم رشد بیش تر و معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P < 0/05$). نتایج این آزمایش نشان داد افزایش ایمنی موکوسی از طریق کاهش ریسک ابتلا به بیماری، با استفاده از ویتامین C به عنوان محرک ایمنی توانسته است اثرات سودمندی داشته باشد.

واژه های کلیدی: ماهی کلمه، *Rutilus rutilus caspicus*، ویتامین C، کمترین غلظت بازدارنده MIC، موکوس اپیدرم

مقدمه

عفونت های باکتریایی بیش تر آبزیان پرورشی را تحت تأثیر قرار می دهند و استفاده از آنتی بیوتیک ها نیز در مدیریت بیماری های آبزیان پرورشی، به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است، که دلایل آن عبارتند از: افزایش مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها، از بین بردن فلور میکروبی محیط زیست، هزینه بالای این داروها و عوارض جانبی داروها بر موجودات آبزی (Gatlin و همکاران،

۲۰۰۶). یکی از بهترین روش ها برای کنترل بیماری در آبی پروری، تقویت مکانیسم دفاعی ماهی برای مواجهه با محرک های سیستم ایمنی است. مواد محرک ایمنی از طریق افزایش قدرت ایمنی لارو ماهیان می توانند بقاء آنها را تا زمانی که سیستم ایمنی اکتسابی آنها کارایی لازم را پیدا نکرده است، افزایش می دهند (Bricknell و Dalmo، ۲۰۰۵). در دهه اخیر استفاده از ویتامین ها به عنوان محرک های سیستم ایمنی در آبی پروری مورد توجه قرار گرفته است (Blazer، ۱۹۹۲). ویتامین C یا آسکوربیک اسید (AA) محلول در آب بوده و دارای نقش های متابولیکی متعددی از

*مسئول مکاتبه: roosta6787@gmail.com

کاهش یافته است. همچنین ماهی کلمه براساس طبقه‌بندی IUCN (۱۹۹۴) از گونه‌های در معرض تهدید محسوب شده است (Kiabi و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به اهمیت ماهی کلمه در تغذیه و ارزش شیلاتی آن برای مردم منطقه شمال کشور، امر تکثیر و پرورش آن به‌منظور بازسازی ذخایر مورد توجه قرار گرفته است؛ بنابراین سعی بر آن است تا با استفاده از برخی مواد افزودنی بتوان میزان بازماندگی این ماهی را افزایش داد. در این راستا شناسایی برخی فاکتورهای ایمنی موکوس به‌عنوان اولین خط دفاعی بدن مورد توجه قرار می‌گیرند. با توجه به مطالعات اندک در خصوص تأثیر ویتامین C بر فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهی، در این مطالعه به بررسی کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد به روش انتشار دیسک در ماهیان تغذیه‌شده با سطوح متفاوت ویتامین C پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی: بچه‌ماهیان کلمه با وزن متوسط $1/4 \pm 0/02$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش سیجوال بندرتراکم تهیه و به مرکز آبی‌پروری منتقل شدند. پس از طی حدود ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به تعداد ۵۵ قطعه و به‌صورت تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در ۱۲ تانک توزیع شدند. آب تانک‌ها از آب لوله‌کشی همراه با هوادهی تامین شدند. دمای آب 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد بود.

تهیه ویتامین C و غذادهی: ویتامین C به‌صورت ال-اسکوربیک اسید از شرکت کره‌ای (Dae Jung) خریداری تهیه و اضافه شد. ویتامین با دوزهای ۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به غذای مورد استفاده با عنوان تجاری بیومار (ساخت شرکت فرانسه) از طریق اسپری صورت گرفت. پودر ویتامین C با ژلاتین ۵ درصد به‌عنوان همبند، مخلوط شده و به غذا اسپری شد. دوره غذادهی ۶۰ روز بود. روزانه غذادهی به‌میزان ۳ درصد وزن بدن در سه

جمله اثر بر رشد، بازماندگی بیش‌تر، بهبود زخم‌ها، کاهش اثرات استرس و مقاومت در برابر عوامل پاتوژن و بهبود عملکرد تولیدمثل می‌باشد (Dabrowski، ۲۰۰۱). نقش مهم ویتامین C در بیش‌تر گروه‌های ماهیان زمانی که دوزهای بیش‌تر از سطح مورد نیاز در جیره به‌کار برده شده، به اثبات رسیده است. در کپور هندی *Cirrhinus mrigala* برای افزایش پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر بیماری و استرس به ۱۰۰۰ میلی‌گرم آسکوربیک اسید به‌ازای هر کیلو وزن بدن نیاز است (Sobhana و همکاران، ۲۰۰۲).

پاسخ اولیه به هجوم عوامل بیماری‌زا، ایمنی اولیه (غیراختصاصی) است. اجزای کلیدی ایمنی ذاتی شامل لایه موکوس روی پوست، آبشش‌ها و مجرای معده- روده‌ای و اجزای تشکیل‌دهنده خون شامل سلول‌های کشنده طبیعی و فاگوسیت‌ها هستند (Chandran و Anbarasu، ۲۰۰۱). موکوس یک بیوفیلم تشکیل می‌دهد که از اپی‌تلیوم در برابر آسیب‌های مکانیکی، آنزیمی و شیمیایی محافظت می‌کند. ارتباط این لایه موکوس و باکتری‌ها در بسیاری از بیماری‌های عفونی مهم است و به‌عنوان اولین خط دفاعی بدن در برابر باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها می‌باشد که فعالیت غیراختصاصی سریعی را در هنگام هجوم عوامل بیماری‌زا از خود نشان می‌دهد (Schroers و همکاران، ۲۰۰۹). فعالیت ضدباکتریایی موکوس پوست ماهیان قبلاً به اثبات رسیده است. کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد به معنای کم‌ترین غلظتی از موکوس است که سبب مهار شدن عامل بیماری‌زا می‌شود که با استفاده از رقت‌های سریالی موکوس و انتشار دیسک می‌توان به این غلظت دست یافت (Helio و همکاران، ۲۰۰۲).

ماهی کلمه متعلق به خانواده کپورماهیان می‌باشد. در سال‌های اخیر، به دلایل مختل (صید غیرقانونی، آلودگی مناطق تخم‌ریزی در دریای خزر، کاهش مهاجرت تولیدمثلی و ...) میزان ذخایر ماهی کلمه

وعده انجام شد.

نمونه برداری: جمع آوری موکوس براساس روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) با کمی اصلاحات انجام شد. از هر تانک ۲۰ عدد ماهی به صورت تصادفی نمونه برداری و پس از بیهوشی با ۵ میلی گرم بر لیتر پودر گل میخک به صورت انفرادی درون کیسه های پلی اتیلنی (زیپ پلاست) شامل ۱۰ میلی لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی مولار قرار گرفتند. ماهیان از ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری غذادهی نشدند. پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه ها خارج و به درون آب پر از اکسیژن قرار گرفتند. موکوس جمع آوری شده به لوله های سانتریفوژ استریل ۱۵ میلی لیتری منتقل و با دور ۱۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. نمونه ها تا زمان انجام آزمایش درون فریزر -۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

تهیه سویه های باکتری: سویه های باکتریایی مورد استفاده در این آزمایش از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه گردید که شامل باکتری های گرم مثبت استرپتوکوکوس فاسیوم *Streptococcus faecium* (ATCC 4698)، میکروکوکوس لوتئوس *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) و باکتری های گرم منفی سراتیا مارسسنس *Serratia marcescens* (CIP 1621, SM) و اشریشیا کلی *Escherichia coli* (ATCC 1554) بود.

آماده سازی محلول مک فارلند: در این مطالعه برای تعیین غلظت مشخص باکتری از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد که معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری می باشد. برای این منظور، جذب نوری غلظت به دست آمده در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید.

تعیین فعالیت ضدباکتریایی و کم ترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) به روش انتشار دیسک: کم ترین غلظت مهارکننده رشد، به معنای غلظتی از موکوس است که می تواند رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند که قابل مشاهده با چشم غیر مسلح

است. برای تعیین غلظت، ابتدا موکوس اولیه در میکروپلیت ۹۶ خانه به صورت مستقیم با آب مقطر رقیق گردید که غلظت های حاصله شامل؛ ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکرولیتر در میلی لیتر بود. زیر هود میکروبی از دو سویه باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی سطح محیط کشت آگار به صورت یکنواخت پخش شد. سپس با استفاده از روش انتشار دیسک، برای هر غلظت از موکوس یک دیسک شاهد در نظر گرفته شد و دیسک های آغشته به غلظت های مختلف موکوس با پنس استریل و به روی پلیت های شامل محیط کشت نوترینت آگار منتقل شدند (هلیو و همکاران، ۲۰۰۲). پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از این مدت قطر هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر توسط کولیس ثبت شدند. برای حصول اطمینان این آزمایش برای هر سویه باکتری ۶ بار تکرار شد.

آنالیزهای آماری: در این آزمایش، نمونه گیری ماهیان در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از بررسی هموزنی واریانس و نرمال بودن داده ها، داده های به دست آمده از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA-One-way و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS 18.00 بررسی گردید.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به کم ترین غلظت بازدارندگی (MIC) موکوس با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری سراتیا مارسسنس، اشریشیا کلی، استرپتوکوکوس فاسیوم و استرپتوکوکوس لوتئوس در جدول های ۱ تا ۴ آمده است. غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر در برابر هر دو نوع باکتری دارای حداقل خاصیت ضدباکتریایی بود و با رقیق شدن موکوس فعالیت ضدباکتریایی آن کاهش یافت. کم ترین غلظت بازدارنده رشد در باکتری سراتیا مارسسنس و اشریشیا کلی، ۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر بود. تیمارهای

تغذیه شده با ویتامین C قطر هاله رشد بیشتر و معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P < 0/05$) (جدول های ۱ و ۲). کمترین غلظت بازدارنده رشد در باکتری استرپتوکوکوس فاسیوم در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر از موکوس مشاهده شد و با رقیق سازی موکوس هیچ گونه فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد. موکوس ماهیان تغذیه شده از ویتامین C اختلاف معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند، اگرچه بین تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P < 0/05$) (جدول ۴).

جدول ۱- تعیین کمترین غلظت بازدارنده عدم رشد بر حسب میلی متر علیه باکتری سراتیا مارسسنس (میانگین \pm انحراف معیار).

غلظت ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره)	غلظت های مختلف موکوس (میکرولیتر در میلی لیتر)				
	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
۰	۹/۱۷ \pm ۰/۳۱Ac	۹/۰۹ \pm ۰/۵۳Ab	۸/۷۷ \pm ۰/۶۵Ab	-	-
۱۰۰۰	۱۱/۰۲ \pm ۰/۰۲Aa	۱۰/۶۶ \pm ۰/۷۱ABa	۱۰/۰۶ \pm ۰/۰۵Ba	-	-
۱۵۰۰	۱۱/۱۹ \pm ۰/۳۶Aa	۱۱/۱۲ \pm ۰/۱۷Aa	۱۰/۳۰ \pm ۰/۵۴Ba	-	-
۲۰۰۰	۹/۸۶ \pm ۰/۸۹Bb	۱۱/۶۲ \pm ۰/۵۶Aa	۸/۵۴ \pm ۰/۹۲Cb	-	-

اعداد با حروف متفاوت کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره) (ستونی) می باشد. اعداد با حروف متفاوت بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین غلظت های مختلف موکوس (ردیفی) می باشد.

جدول ۲- تعیین کمترین غلظت بازدارنده عدم رشد بر حسب میلی متر علیه باکتری اشریشیا کلی (میانگین \pm انحراف معیار).

غلظت ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره)	غلظت های مختلف موکوس (میکرولیتر در میلی لیتر)				
	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
۰	۸/۹۲ \pm ۰/۶۹Ab	۷/۹۹ \pm ۰/۷۳ABb	۷/۴۲ \pm ۰/۴۸Bb	-	-
۱۰۰۰	۱۱/۷۲ \pm ۰/۷۴Aa	۱۰/۲۳ \pm ۰/۵۳Ba	۸/۶۹ \pm ۰/۳۹Cb	-	-
۱۵۰۰	۱۱/۳۹ \pm ۱/۳۵Aa	۱۰/۰۱ \pm ۰/۱۵ABa	۸/۹۴ \pm ۰/۱۹Ba	-	-
۲۰۰۰	۱۰/۹۳ \pm ۰/۹۱Aa	۹/۹۷ \pm ۰/۱۳ABa	۹/۱۳ \pm ۰/۰۵Ba	-	-

اعداد با حروف متفاوت کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره) (ستونی) می باشد. اعداد با حروف متفاوت بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین غلظت های مختلف موکوس (ردیفی) می باشد.

جدول ۳- تعیین کمترین غلظت بازدارنده عدم رشد بر حسب میلی متر علیه باکتری میکروکوکوس لوتنوس (میانگین \pm انحراف معیار).

غلظت ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره)	غلظت های مختلف موکوس (میکرولیتر در میلی لیتر)				
	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
۰	۸/۵۷ \pm ۰/۵۰Ac	۸/۰۹ \pm ۰/۵۱Ab	-	-	-
۱۰۰۰	۱۱/۰۲ \pm ۰/۱۳Aab	۱۰/۱۹ \pm ۱/۶۴Bab	-	-	-
۱۵۰۰	۱۱/۵۳ \pm ۰/۴۴Aa	۱۰/۸۹ \pm ۰/۷۵Bab	-	-	-
۲۰۰۰	۱۰/۵۹ \pm ۰/۴۱Ab	۱۰/۲۹ \pm ۱/۳۳Aa	-	-	-

جدول ۴- تعیین کمترین غلظت بازدارنده عدم رشد بر حسب میلی متر علیه باکتری استرپتوکوکوس فاسیوم (میانگین \pm انحراف معیار).

غلظت ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره)	غلظت های مختلف موکوس (میکرولیتر در میلی لیتر)				
	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
۰	۸/۰۵ \pm ۰/۹۲a	-	-	-	-
۱۰۰۰	۹/۵۱ \pm ۰/۳۰b	-	-	-	-
۱۵۰۰	۹/۸۳ \pm ۰/۳۵b	-	-	-	-
۲۰۰۰	۹/۹۶ \pm ۰/۹۳b	-	-	-	-

اعداد با حروف متفاوت کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف ویتامین C (میلی گرم در کیلوگرم جیره) می باشد.

افزایش معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم در تیمار شامل ویتامین C در ماه‌های اول و دوم؛ به‌ترتیب مشاهده نمودند. نتایج نشان داد که ویتامین C با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به اینولین، برای یک ماه می‌تواند جیره مکملی بهتر با هزینه‌ای کم‌تر باشد که اثر مثبت روی رشد، هماتولوژی، ایمنی غیراختصاصی و مقاومت در برابر باکتری *A. hydrophilla* را به همراه داشته است. Ai و همکاران (۲۰۰۴) افزایش فعالیت ایمنی ذاتی (افزایش لیزوزیم و عامل مکمل در سرم) را با افزایش اسید آسکوربیک جیره در ماهی *Lateobrax japonicas* دریایی ژاپنی را گزارش کردند. سلیمانی و همکاران (۱۳۸۷) تأثیر ویتامین C تزریق شده را بر مقاومت بچه‌ماهی کپور در مقابله با انگل تک‌یاخته *Ichthyophthirius multifiliis* بررسی کردند. نتایج نشان داد افزایش دوز ویتامین C تزریقی تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن ماهی، روی کاهش میزان مرگ و میر تأثیر مثبت و قابل‌ملاحظه‌ای داشته است که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد که در این آزمایش نیز ویتامین C از طریق افزایش فعالیت ضدباکتریایی موکوس اثر خود را بر سیستم ایمنی گذاشته است و با توجه به جایگاه ماهی کلمه و اهمیت افزایش ایمنی موکوسی از طریق کاهش ریسک ابتلا به بیماری، استفاده از ویتامین C به‌عنوان محرک ایمنی می‌تواند اثرات سودمندی داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات بی‌دریغ مرکز تکثیر و پرورش سیجوال بندرترکمن و پرسنل محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که در اجرای این پژوهش ما را یاری نموده‌اند سپاسگزاری می‌نمائیم.

موکوس به‌عنوان جزئی از مکانیسم ایمنی ذاتی علاوه‌بر این‌که با ریختن پوست و بافت مرده و تولید مداوم آن، همیشه وجود دارد و از اتصال پاتوژن‌ها نیز جلوگیری می‌کند (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۷). کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای ژنتیکی مربوط به گونه ماهی، سن، تغذیه، فاکتورهای محیطی و وجود یا عدم وجود فاکتورهای استرس‌زا در قبل یا در زمان نمونه‌برداری موکوس است (سلطانی، ۱۳۷۷). در خصوص حساسیت سویه‌ها به مواد دارای خواص ضدباکتریایی در موکوس ماهیان نیز Subramanian و همکاران (۲۰۰۸) پس از بررسی اثرات ضدباکتریایی موکوس گونه‌های مختلفی از ماهیان در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها به روش رقت‌های متوالی نشان دادند که باکتری اشرشیاکلی نسبت به سایر سویه‌ها حساسیت بیشتری دارد. Bragadeeswaran و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضدباکتریایی موکوس ایدرم کفشک ماهی *Cynglossus arel* و گربه‌ماهی *Arius caelatus* را در برابر باکتری‌های پاتوژن انسانی با روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار دادند و بیان کردند که موکوس این دو گونه ماهی فعالیت ضدباکتریایی دارند که با این پژوهش هم‌سو است. Vennila و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آلی، اسیدی و آبی موکوس ماهیان *Himantura* و *Dasyatis sephen* را در برابر باکتری‌های مختلف با روش انتشار دیسک بررسی کردند. در عصاره آبی هیچ‌کدام از نمونه‌های موکوسی، فعالیت بازدارندگی از رشد مشاهده نشد.

Ibrahem و همکاران (۲۰۱۰) در مقایسه‌ای که بین تأثیر پرپیوتیک اینولین و ویتامین C اضافه شده به جیره غذایی بر ایمنی ذاتی نیل تیلایا *Oreochromis nilotiucus* با وزن متوسط ۱۱ گرم انجام دادند؛

منابع

- ۱- سلطانی، م.، ۱۳۷۷. ویژگی‌های ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۱ و ۲. صفحات ۳۱-۳۴.
- ۲- سلیمانی، ن.، حاجی‌مرادلو، ع.، قربانی، ر.، خوشباور رستمی، ح.، و حسن‌آبادی، ز.، ۱۳۸۷. تأثیر مقادیر مختلف ویتامین C تزریقی بر بقا ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* در مقابله با دوزهای مختلف ترونت انگل ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیپس، *Ichthyophytirius multifilis*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد پانزدهم، شماره ششم.
3. Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., and Liufu, Z., 2004. Effect of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. *Aquaculture*. 242, 489-500.
4. Anbarasu, K., and Chandran, M.R., 2001. Effects of ascorbic acid on the immune response of the catfish (*Mystus gulio*) (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish. Shellfish Immunol.* 11 (7:9), 347-355.
5. Blazer, V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 2 (8), 309-323.
6. Bragadeeswaran, S., Priyadharshini, S., Prabhu, K., and Rani, S.R.S., 2011. Antimicrobial 216 and hemolytic activity of fish epidermal mucus (*Cynoglossus arel*) and (*Arius caelatus*). *Asian Pacific J. Trop. Med.* 4, 305-309.
7. Bricknell, I., and Dalmo, R.A., 2005. The use of immune-stimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19 (3:6:10), 457-472.
8. Dabrowski, K., 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC Press. Boca Raton, 288p.
9. Gatlin, D.M., Li, P., Wang, X., Burr, G.S., Castille, F., and Lawrence, A.L., 2006. Potential application of prebiotics in aquaculture. 8th International symposium on aquaculture nutrition, 1, 371-376.
10. Hellio, C., Pons, AM., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., and Gal, YL., 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *Inter. J. Antimicrobial. Agents*. 20, 214-219.
11. Ibrahem, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., and Abd El-Aty, A.M., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 29, 241-246.
12. Kiabi, B., Abdoli, A., and Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran. *J. Zool. Mid. East*, 1, 57-65.
13. Ross, N.W., Firth, J.K., Wang, A., Burka, F., and Johnson, S.C., 2000. Change in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Dis Aquat. Organ.* 41, 43-51.
14. Schroers, V., Marel, M., Neuhaus, H., and Steinhagen, D., 2009. Changes of intestinal mucus glycoproteins after per-oral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 288 (14), 184-189.
15. Sobhana, K.S., Mohan, C.V., and Shankar, K.M., 2002. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of marigal *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *J. Aquacul.* 207 (4), 225-238.
16. Subramanian, S., MacKinnon, Sh.L., and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148, 256-263.
17. Subramanian, S., Ross, N.W., and MacKinnon, Sh.L., 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 15, 85-92.
18. Vennila, R., Kummur, K.R., Kanchana, Sh., Arumugam, M., and Vijayalakshmi, Sh., 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* pp. 239-243.

The of minimum inhibitory concentration of growth in the epidermal mucus of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fed dietary supplemented with different levels of vitamin C by disc diffusion method

***Z. Roosta¹, A.M. Hajimoradloo¹ and R. Ghorbani¹**

¹ Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of different levels of vitamin C on the minimum inhibitory concentration of mucus of Caspian roach, *Rutilus rutilus caspicus*. Six hundred and sixty fish were obtained from Sijaval aquaculture center (Torkemen Port) and after 2 weeks acclimation, were distributed in 12 tanks with 4 treatments and 3 replicate (55 fish in each tank). Vitamin C with 0, 1000, 1500 and 2000 mg/ kg diet doses were added to food for 60 days. At the end of trial mucus were diluted with distilled water that was 200, 100, 50, 25 and 12.5 micro liter/ ml liter and they were put against gram-positive bacteria *Streptococcus faecium*, *Micrococcus luteus* and Gram-negative bacteria *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*. The results by disc diffusion method were showed that 200 µl/ml concentration of mucus have minimum antibacterial activity against two strains of bacteria. Dilution of mucus decreased the antibacterial activity. Inhibition zone diameter in fish fed with different levels of vitamin C significant increase compared to control group (P<0.05). The results of this study were showed that increase of mucus immunity by means of disease decrease was obtained with vitamin C as an immune stimulant that is influence affects.

Keywords: Epidermal mucus, Minimum inhibition concentration, Vitamin C, Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*)

* Corresponding authors; roosta6787@gmail.com