تأثیر سطوح مختلف ویتامین C بر برخی شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی بنی *(Barbus sharpeyi)*

فریال جواهرزاده‌دزفول[1*]، مجتبی علیشاهی[2]، مژده چله‌مال‌دزفولی‌نژاد[3]، مهران جواهری[3]

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

چکیده

ماهی بنی یکی از ماهیان بومی استان خوزستان است که اخیرا تکثیر مصنوعی و پرورش آن در استان رواج یافته ولی اطلاعات کمی در مورد نیازهای غذایی آن در دست است. لذا در این تحقیق اثر تحریک رشد حاصل از تغذیه ماهی بنی با غلظت‌های مختلف ویتامین C در مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ۳۷۵ عدد ماهی بنی با متوسط وزن ۲/۲۶±۲۱/۶ گرم بصورت تصادفی به پنج تیمار ، هر تیمار در سه تکرار، تقسیم گردیدند. و تیمارها به ترتیب با غلظت‌های ۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. در انتهای دوره از ماهی‌های هر تیمار خونگیری شده ، فاکتورهای خونی و فاکتورهای ایمنی بین تیمارها مقایسه گردید. ده ماهی در هر تکرار در انتهای دوره با باکتری آئروموناس هیدروفیلا چالش داده شده و تلفات تا ۱۴ روز ثبت گردید. نتایج نشان داد از نظر شاخص‌های خون شناسی اختلاف معنی داری در بین تیمارها در هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز مشاهده نگردید($P>0.05$)، ولی در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی نسبت به تیمار کنترل مشاهده گردید($P<0.05$) . میزان فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم نسبت به تیمار کنترل افزایش معنی داری نشان داد($P<0.05$) ولی بقیه تیمارها تفاوت معنی داری نسبت به تیمار کنترل نداشتند($P>0.05$). میزان قدرت باکتری کشی سرم ماهی‌ها تفاوت معنی داری بین تیمارها نشان نداد($P>0.05$). میزان تلفات بعد از چالش نیز در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ویتامین C کاهش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد، در صورتیکه این کاهش تلفات در سایر تیمارها با تیمار کنترل معنی دار نبود($P>0.05$). بطور کلی می توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بالای ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک توانایی تاثیر بر ایمنی ماهی بنی را دارند.

واژگان کلیدی: ماهی بنی، ویتامین C، فاکتورهای ایمنی، شاخص خونی

مقدمه

نام علمی این ماهی *Barbus sharpeyi* می‌باشد. ماهی بنّی بدنی کشیده و دوکی شکل دارد که از دو طرف پهن گردیده است. دهان در ناحیه قدامی و دارای حفره دهانی نسبتا بزرگی می‌باشد (۱).

این ماهی بومی مناطق جنوبی ایران، بخشهایی از کشور عراق، سوریه و ترکیه بوده و اخیرا در کشور به

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز- ایران
۲- استادیار،گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز- ایران
۳- استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، اهواز- ایران
*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: f.javaherzadeh@gmail.com

علت مقاومت بالای نسبت به شرایط محیطی، ویژگی‌های نسبتا مناسب پرورشی و بازار پسندی خوب به منظور ایجاد تنوع در گونه‌های پرورشی، مورد توجه واقع شده است(۱).

اصولاً فعالیتی در آبزی پروری موفق خواهد بود که یک پرورش دهنده به کلیه بیوتکنیک تکثیر و پرورش آن گونه اشراف کامل داشته باشد .علی رغم پیشرفت‌های خوبی که طی چند سال اخیر در مورد تکثیر و پرورش ماهی بنی صورت گرفته است لیکن اطلاعات جامع و کاملی در مورد نیازهای تغذیه ای این ماهیان وجود ندارد. درچند سال گذشته به محرک‌های ایمنی با منشاء حیوانی یا گیاهی (گلوکان، کتین و کیتوزان، عصاره‌های گیاهی) و نیز ویتامین‌ها (بویژه ویتامین C) توجه بسیاری شده است. وجود بسیاری از ویتامین‌ها به عنوان میکرونوترینت‌ها در جیره ضروری است (۲۲)ویتامین C یکی از ویتامین‌های حساس بوده که دارای نقش‌های متابولیک متعددی منجمله اثر بر رشد، بازماندگی و جلوگیری از مرگ و میر، بهبود زخم ها، کاهش اثرات استرس و مقاومت در برابرعوامل پاتوژن و بهبود عملکرد تولید مثل می باشد(۸ ، ۱۸). مطالعات نشان میدهند که اکثر ماهیان استخوانی بدلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان ال گلونولاکتون اکسیداز(L- Glonolactone oxidase)(GLO) قادر به سنتز ویتامین C از ال گلوکز نبوده لذا ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین را از راه تغذیه خارجی تأمین نمایند(۲۰). ماهی بنی نیز از ماهیان استخوانی است که قادر به سنتز این آنزیم نبوده و باید این ویتامین را از راه تغذیه به ماهی وارد نماییم. لذا با توجه ضرورت معرفی گونه‌های جدید پرورشی و ویژگی‌های مناسب پرورشی ماهی بنی و همچنین عدم وجود اطلاعات لازم در زمینه نیازهای ویتامینی این گونه، مطالعه مذکور با هدف بررسی تاثیر مقادیر مختلف ویتامینC جیره بر برخی فاکتورهای ایمنی و خونی ماهی بنی انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

تعداد ۳۷۵ عدد بچه ماهی بنی با وزن متوسط ۲۱/٦±۲/۲٦ از یکی از مزارع پرورش ماهی مرکز پرورش ماهی آزادگان در جنوب اهواز خریداری و با استفاده از کپسول اکسیژن و مخازن مخصوص حمل ماهی به دانشکده دامپزشکی اهواز منتقل گردید. ماهی‌ها از نظر ظاهری و بررسی‌های متداول کلینیکی مورد بررسی قرار گرفته و به ظاهر سالم بودند و به مدت یک هفته به منظور سازش یابی با شرایط در مخازن با خوراک معمولی تغذیه گردیدند.

۱۵آکواریوم ۱۵۰ لیتری در آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز برای انجام طرح در نظر گرفته شد. بعد از ضد عفونی و آماده سازی آکواریوم‌ها، آبگیری آنها صورت گرفت. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در تحقیق به قرار زیر بود:

–دما: ۱±۲۵°c؛ اکسیژن محلول: ۱۰–۸ ppm ؛ PH ۷/۹±۰/۳ ؛ NO2<۰/۰۱ ppm ؛ NH3<۰/۱ ppm و میزان تعویض روزانه آب ۱۰٪ حجم آب بود.

–خوراک پایه مخصوص ماهی بنی بر اساس جیره توصیه شده توسط کاظمی (۱۳۸۸) تهیه گردید. سپس مقادیر صفر، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم ویتامین C در کیلوگرم خوراک فوق تهیه شده و هر تیمار در سه تکرار در نظر گرفته شد. (٤)

–ویتامین C مورد استفاده از نوع پایدار در آب (L-ascorbyl-2-(polyphosphate و ساخت شرکت (F.Hoffman-La Roche® (Basel,Swit zerland بود.

به منظور تهیه خوراک پایه ازآرد ذرت، آرد جو، آرد گندم، سبوس برنج، سبوس گندم، روغن آفتاب گردان، پودر زئولیت، مخلوط ویتامین با نسبت‌های توصیه شده توسط کاظمی، ۱۳۸۸ (٤) استفاده گردید.

اجزای خوراک به خوبی پودر گردیدند.

اجزاری جیره نهایی شامل : ۹۳/۷ در صد ماده خشک، ۲۵/۰۸ پروتئین، ۱۲/۲ چربی، ۷/۲ خاکستر و ٦/۷۵ فیبر بود برای اطمینان از میزان ویتامین C جیره پایه آن را به آزمایشگاه فرستادیم و با روش HPLC میزان ویتامین C، ۲±۱۵ بدست آمد.

ویتامین C پس از مخلوط شدن اولیه با جیره در دستگاه مخلوط کن، به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط سپس آب به آن اضافه شده و عمل مخلوط کردن ۱۵ دقیقه دیگر ادامه پیدا کرد. سپس جیره‌ها دو بار از چرخ گوشت گذرانده شده و توسط خشک کن خشک گردیده اندازه دانه‌های مورد نظر ۱/۸ تا ۱/۹ میلی متر تنظیم گردید.

طول دوره پرورش ٦۰ روز بود، میزان غذا را براساس۳٪وزن بیوماس داده می شود.در دو نوبت صبح و بعدازظهر و دوره نوری به طور طبیعی (١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی)تغذیه صورت می گیرد.

پس از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده بیهوشی MS222 با دوز ۳۰ میلی گرم در لیتر بوسیله سرنگ انسولین با استفاده از ماده ضد انعقاد هپارین به میزان ۲۰ میکرولیتر به ازای هر میلی لیتر خون از ورید ساقه دمی خونگیری انجام شد. پس از شماره گذاری لوله‌های آزمایش نمونه خون به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگه‌داری شده و سپس پلاسما آن با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی گردید. سرم‌ها در ۲۰- درجه سانتی-گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند.

-آزمایش‌های انجام شده روی نمونه‌ها:

-اندازه‌گیری لایزوزیم سرم

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت Agarose lysoplate Method توصیه شده توسط Osserman وLawlor (١٩٦٦) و Roed و همکاران (۱۹۹۳) با مقداری تغییرات استفاده گردید. در این روش ابتدا پودر آگارز به میزان ۱٪ در بافر ۰/۱ مول فسفات سیترات/ سیترات با pH=۵/۸ حل گردید. (۲۳ و ۲۵) با حرارت دادن محلول به همراه هم‌زن مغناطیسی، بافر همراه آگارز به دمای جوش رسیده، به آرامی آگارز سرد گردید. وقتی دمای آگارز به حدود دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، میزان ۰/۲ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر از پودر باکتری *میکروکوکوس لیزودایکتیکوس* (سیگما) به آگارز اضافه شده و قبل از تبدیل وضعیت آگارز از مایع به جامد، آگارز روی پتری دیش استریل ریخته شد تا بصورت لایه ای به قطر حدود ۵ میلی متر، جامد گردد. چاهک هایی به قطر ٤ میلی متر به فاصله ۲/۵ سانتی متر در ژل بوسیله پانچ‌های خاص ایجاد شده و سرم نمونه در سه تکرار به گوده‌ها اضافه گردید. ژل‌ها به مدت ٢٤ ساعت در شرایط اطاقک مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری میکروکوک در اطراف گوده با خط کش دقیق، اندازه گیری شد. از رقت‌های متوالی لایزوزیم خالص مرغی (سیگما) نیز برای رسم نمودار فعالیت لایزوزیم به همین روش استفاده شده و در انتها میزان فعالیت لیز سلولی سرم‌های مورد آزمایش با نمودار استاندارد فعالیت لایزوزیم مرغی ترسیم شده مقایسه گردید، و میزان فعالیت لایزوزیم هر نمونه مشخص گردید.

-بررسی قدرت باکتری کشی سرم

برای اندازه گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات استفاده گردید. (١٦)

ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ٤٨ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلولهای باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دوردر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری وبا افزودن مقداری بافرفسفات سدیم استریل به آنها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ٥٤٠ نانومتر برابر ۱

تنظیم گردید. تعداد باکتری در سوسپانسیون حاصل شمارش شده و با استفاده از روش تهیه رقت‌های متوالی بر مبنای ده، سوسپانسیون ۱۰۵ باکتری در میلی لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH= ۷/۵) و حاوی ۰/۵ میلی مول در میلی لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی مول در میلی لیتر یون منیزیم) تهیه گردید.

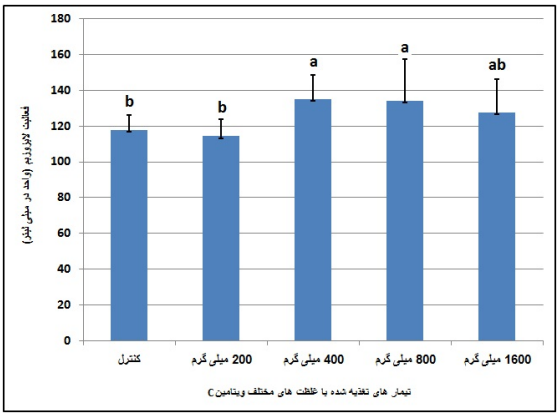
نمونه‌های سرمی به نسبت (بافر: سرم)۱:۳ با بافر فوق رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده ترکیب شده و بمدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با حرکت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج بصورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش گردید.

-آزمون آماری

برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱٦ استفاده گردید. ابتدا اثر متقابل زمان بر گروهها مورد ارزیابی قرار گرفت (Interaction). و با توجه به عدم تاثیر متقابل این دو فاکتور از آنوای یکطرفه برای بررسی تفاوت میانگین تیمارهای مختلف ویتامین C استفاده گردید. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی Duncan در سطح اعتماد۹۵٪ استفاده شد. (۵)

نتایج

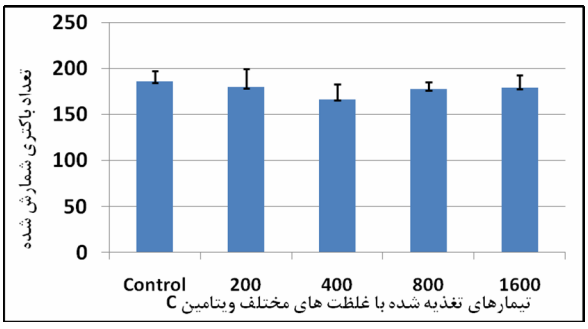
نتایج حاصل از تجویز خوراکی ویتامین C با دوزهای مختلف و تاثیر بر روی فاکتورهای ایمنی:



نمودار ۱- مقایسه فعالیت لایزوزیم بین تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف ویتامین C (حروف غیر همنام در روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد)

-فعالیت لایزوزیم سرم:

نتایج مربوط به مقایسه‌ی فعالیت لایزوزیم سرم بین تیمارهای مختلف در نمودار شماره ۱ آورده شده است. بیشترین فعالیت لایزوزیم در تیمارهای ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C مشاهده گردید($P<0.05$) که این میزان فعالیت بطور معنی داری از تیمار کنترل بیشتر بود، ولی تیمار ۲۰۰ و ۱٦۰۰ افزایش معنی داری نسبت به کنترل نداشتند ($P>0.05$) هر چند افزایش فعالیت نسبی در تیمار ۱٦۰۰ نیز مشاهده گردید.

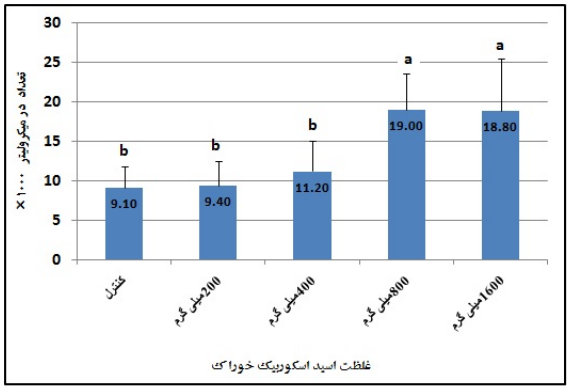


نمودار ۲- تعداد باکتری شمارش شده بین تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف ویتامین C

-قدرت باکتری کشی:

نتایج مربوط به تعداد باکتری شمارش شده بین تیمارهای مختلف در نمودار شماره 2 آورده شده است. تعداد باکتری شمارش شده در بین تیمارهای

مورد بررسی تفاوت معنی داری نداشت(P>0.05).



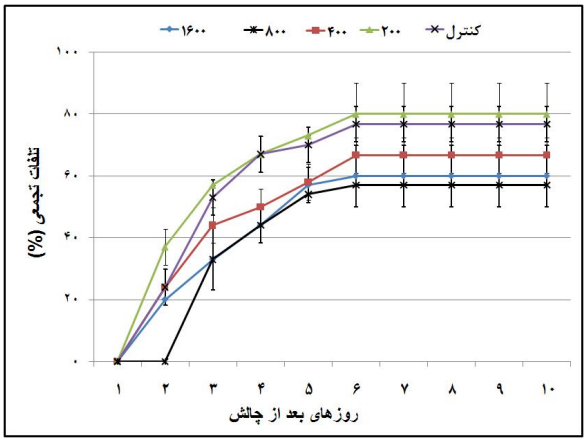
نمودار ۳- تعداد گلبولهای سفید خونی در تیمارهای مختلف تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C (حروف غیر همنام در روی هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ می باشد)

- تعداد گلبولهای سفید خونی

نتایج مربوط تعداد گلبولهای سفید خونی در تیمارهای مختلف در نمودار شماره ۳ آورده شده است. بیشترین تعداد در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C مشاهده گردید(P<0.05) که این میزان بطور معنی داری از تیمار کنترل بیشتر بود ولی در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ افزایش معنی داری نسبت به کنترل نداشتند (P>0.05) .

-چالش باکتریایی

تلفات بعد از چالش باکتریایی در تیمارهای ۱۶۰۰ و ۸۰۰ کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<0.05) در صورتیکه تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ در تلفات بعد از چالش تغییری ایجاد ننمودند(P>0.05). هر چند در تیمار ۴۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C کاهش نسبی تلفات مشاهده گردید.



نمودار ۴- نتیجه چالش باکتریایی تیمارهای مورد بررسی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا

۲- فاکتورهای خونی

اطلاعات مربوط به شاخص‌های خونی در جدول شماره ۱ آورده شده است.هیچ کدام از فاکتورهای مورد بررسی شامل (PCV، HB، RBC، MCV، MCH و MCHC)در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. (P>0.05)

جدول ۱- نتیجه اندازه گیری شاخص‌های خون شناسی در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C و گروه شاهد

میانگین	PCV	HB	RBC	MCV	MCH	MCHC
کنترل	۴۲/۶۰±۴/۳۹	۷/۳۹±۰/۹۹	۱/۵۷±۰/۴۴	۲۸۷/۴۶±۸۲/۰۷	۵۰/۴۶±۱۷/۷۰	۱۷/۵۰±۳/۰۳
۲۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۴۲/۴۷±۹/۴۸	۷/۲۴±۱/۱۱	۱/۴۹±۰/۳۳	۲۹۹/۸۸±۹۴/۵۲	۵۱/۱۷±۱۴/۴۴	۱۷/۷۷±۴/۴۰
۴۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۴۴/۴۷±۳/۷۲	۸/۱۰±۱/۱۱	۱/۷۳±۰/۴۳	۲۶۹/۷۷±۶۱/۰۵	۴۹/۹۰±۱۴/۱۸	۱۸/۳۹±۳/۱۵
۸۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۴۴/۵۳±۳/۷۶	۸/۱۲±۱/۴۶	۱/۷۲±۰/۶۵	۲۹۵/۰۹±۱۰۸/۹۸	۵۴/۰۵±۲۲/۵۱	۱۸/۳۴±۳/۶۲
۱۶۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۴۶/۲۰±۴/۰۹	۸/۰۹±۲/۲۶	۱/۷۹±۰/۵۰	۲۸۰/۸۲±۹۳/۵۳	۵۰/۵۱±۲۳/۸۶	۱۷/۵۶±۴/۷۲

نتایج مربوط به شمارش تفریقی گلبول های سفید خونی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- نتیجه اندازه گیری نسبت گلبولهای سفید خونی در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی غلظت‌های ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ١٦۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C و گروه شاهد(اطلاعات بر اساس میانگین± انحراف معیار آورده شده است و علامت a نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۱ است).

میانگین	تعداد گلبولهای سفید	لنفوسیت	نوتروفیل	مونوسیت
کنترل	۹/۱۰±۲/۶۶	۶۵/۵±۴/۴	۱۹/۵±۷/۱	۱۷/۵±۷/۶
۲۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۹/۴۰±۳/۰۴	۶۵/۵±۷/۱	۱۶/۸±۶/۴	۱۸/۶±۷/۳
۴۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۱۱/۲۰±۳/۸۸ b	۵۷/۵±۳/۸a	۱۹/۰±۷/۱ b	۲۲/۶±۵/۰a
۸۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۱۹/۰۰±۴/۵۴ b	۵۵/۶±۸/۶a	۲۳/۱±۵/۳a	۲۰/۹±۴/۰a
۱۶۰۰میلی گرم در کیلو گرم	۱۸/۸۰±۶/۶۱ b	۵۷/۷±۱۳/۵a	۲۳/۶±۸/۷a	۱۵/۴±۵/۰b

تعداد لنفوسیت در تیمارهای ٤۰۰، ۸۰۰ و ١٦۰۰کاهش معنی‌دار و تعداد نوتروفیل در تیمارهای ۸۰۰ و ١٦۰۰ افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد($P>0.05$).

بحث

از آنجا که ماهی بنی یک گونه گرمایی است و در خوزستان پرورش داده می‌شود دارای ارزش اقتصادی می‌باشد، تلاش در افزایش قدرت ایمنی این ماهی در برابر بیماریهای متعدد و رسیدن برای رشد بهتر اهمیت ویژه‌ای دارد(۱۲). از بین محرک‌های ایمنی، افزودنی‌های غذایی یکی از انواع محرک‌های ایمنی می باشند که ویتامین‌ها از شاخص ترین افزودنی‌های غذایی دخیل در پاسخ ایمنی ماهی هستند(۱۳).

غلظت‌های ٤۰۰، ۸۰۰ افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم را باعث شده اند.تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در قدرت باکتری کشی سرم مشاهده نشد ولی این قدرت نسبتا در تیمار ٤۰۰ و ۸۰۰ بیشتر از سایر تیمارها بود.

از فاکتورهای مورد بررسی میزان فعالیت لایزوزیم تحت تاثیر تجویز خوراکی ویتامین C قرار گرفت، بطوریکه میزان فعالیت لایزوزیم در برخی تیمارهای تغذیه شده با خوراک حاوی ویتامین C افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد($P<0.05$).که این میزان در تیمارهای ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C در غذا افزایش معنی داری نشان داد.

لایزوزیم پروتئینی با ارزش در ماهی است که یکی از اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی ماهی بوده و باعث تخریب جدار باکتری ها، فعال سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه خواری، به عنوان اپسونین، در ماهی می گردد(٢٦، ۹). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (۲۸). همچنین افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کاراس (۷)، ماهی کروکر زرد (۱۵، ٦) و ماهی کپور معمولی (١٤) بعد از تجویز خوراکی عصاره‌های گیاهی گزارش شده است. در این بررسی نیز افزایش فعالیت لایزوزیم سرم گویای بهبود وضعیت ایمنی ماهی است و افزایش فعالیت لایزوزیم به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌ها کمک می نماید.

Garcia و همکاران (۲۰۰۷) بهبود برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی Piaractus mesopotamicus که با جیره غذایی ویتامین CوE غذا دهی شده بود را گزارش نمودند و همچنین افزایش مقاومت در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا را در تیمارها مشاهده نمودند. (۱۲)

Muntro و همکاران (۱۹۹۸) با تجویز ویتامین C و E بهبود پاسخ ایمنی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در Sea bream را گزارش کردند. (۲۱)

همچنین قنواتی (۱۳۸۸) و علیشاهی و همکاران، (۱۳۸۳) تجویز محرک‌های ایمنی با منشائ گیاهی بصورت خوراکی در ماهی کپور معمولی را باعث افزایش معنی دار فعالیت لایزوزیم سرم دانستند که با نتایج این تحقیق که ویتامین C به عنوان محرک ایمنی استفاده شده مطابقت دارد. (۲ و ۳)

در این بررسی همانطور که از نمودار شماره ۴ مشخص است تعداد باکتری زنده شمارش شده در تیمار تغذیه شده با ویتامین Cاختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. عدم تغییر قدرت باکتری کشی سرم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی در برخی تحقیقات گزارش گردیده است(۲٤).

در مورد تاثیر ویتامین C بر فاکتورهای هماتولوژی تحقیقات متعددی انجام شده است. ولی نتایج متفاوتی از تاثیر ویتامین C بر فاکتورهای هماتولوژی ماهی گزارش گردیده است، Garcia و همکاران (۲۰۰۷) تحقیقی بر روی فاکتورهای خون شناسی ماهی Piaractus mesopotamicus که با جیره غذایی ویتامین CوE غذا دهی شده و با باکتری آئروموناس هیدروفیلا چالش داده شده بود انجام دادند. (۱۲) و تاثیر این ویتامین‌ها بر برخی فاکتورهای خونی را گزارش نمودند. همچنین گزارشات دیگری از تاثیر ویتامین C و سایر محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی‌های مختلف وجود دارد (۱٦، ۱۹). در تحقیق جاری حجم فشرده گلبولی (PCV) و تعداد گلبولهای قرمز و میزان هموگلوبین و نیز اندیس‌های گلبولی MCV ، MCH و MCHC هیچکدام تحت تاثیر تجویز خوراکی ویتامین C در غلظت‌های مختلف قرار نگرفت ($P>0.05$). این نتایج نشان دهنده عدم تاثیر ویتامین C در فاکتورهای خونی مربوط به گلبولهای قرمز می‌باشد. به عبارت دیگر علیرغم تحریک رشد و ایمنی بدنبال تجویز خوراکی ویتامین C، فعالیت هماتوپوئتیک (خونسازی) و نیز میزان تخریب گلبولی تحت تاثیر تجویز این ویتامین قرار نگرفته است. نتایج مشابهی از تحقیقات دیگر نیز گزارش گردیده است (۲٦). البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد بویژه ماهی بر خلاف حیوانات خونگرم بطور قابل توجهی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف، مثل استرس، دما، فصل، تغذیه و.... قرار گرفته و تابلوی خوبی برای بررسی وضعیت سلامت یا ایمنی ماهی به شمار نمی رود(۱۳).

علیرغم عدم تاثیر بر گلبولهای قرمز، تعداد گلبولهای سفید خونی در تیمار ویتامین C با غلظت ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک، افزایش معنی داری را نسبت به تیمار کنترل نشان داد. از آنجا که گلبولهای سفید خونی، بویژه لمفوسیت‌های B و T نقش عمده ای در سیستم دفاعی ماهی دارند، تغییر تعداد این سلولها تحت تاثیر محرک‌های ایمنی منطقی به نظر می‌رسد. از طرفی بسیاری از مواد هومورال غیر اختصاصی سیستم ایمنی ماهی توسط گلبولیهای سفید خونی ترشح می شوند، که افزایش این فاکتورهای هومورال تحت تاثیر افزایش تعداد لکوسیتهای خونی بوده است. افزایش تعداد گلبولهای سفید خونی در عفونت‌های طبیعی و تجربی و در مواقع استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی متعدد گزارش شده است(۱٦، ۱۹، ۲٦، ۱۰).

گزارشات مشابه دیگری نیز از تغییر تعداد لکوسیت‌ها بعد از استفاده از افزودنی‌های خوراکی و محرک‌های ایمنی در ماهی‌های مختلف وجود دارد(۱۷).

در مورد اثر ویتامین C بر نسبت گلبولهای سفید خونی دراین تحقیق مشاهده گردید که با وجود افزایش کلی تعداد گلبولهای سفید، در نسبت لکوسیت‌های خونی تغییر معنی‌داری ایجاد نگردید. هر چند ظاهرا تعداد لمفوسیت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش و نسبت هتروفیل‌ها افزایش نشان می دهد. که این یافته‌ها با یافته‌های محققین دیگر در سایر ماهیها مطابقت دارد(۱۷، ۲۷).

بعنوان نتیجه گیری کلی و بر اساس یافته‌های این تحقیق می توان ادعا نمود که ویتامین C در روش خوراکی ایمنی غیر اختصاصی را در ماهی بنی تحریک نموده است ولی بر فاکتورهای خونی وابسته به گلبولهای قرمز بی تاثیر بوده و افزایش تعداد گلبولهای سفید خونی را باعث شده است و بهترین دوز پیشنهادی میزان ۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم می باشد.

منابع

۱- حمیدیان، غ(۱۳۸۲): مطالعه ساختار بافت‌شناسی و هیستومتریک پوست نواحی مختلف ماهی بنی (Barbus sharpeyi)، پایان‌نامه برای دریافت دکترای عمومی از دانشگاه شهید چمران اهواز، شماره ۸۲۵۸٤۸۱، صفحه ۱۳.

۲- علیشاهی، م. (۱۳۸۳): نقش محرک های ایمنی در آبزی پروری، مجله سازمان نظام دامپزشکی کشور، سال چهارم، شماره سوم: ص ۳۸-۳۳.

۳- قنواتی، م. (۱۳۸۸): اثر عصاره داروا‌ش Viscum album و سیاه دانهNigella sativa بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و کارایی واکسن آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio)، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات اهواز.

٤- کاظمی، ف. (۱۳۸۸): تاثیر نسبت‌های مختلف کربوهیدرات به چربی جیره در شاخص‌های رشد، تغذیه و ترکیبات لاشه در ماهی بنی جوان پایان نامه کارشناسی ارشد شماره ۰٦: ٦۰۱-۸۸.

۵- نظیفی، س. (۱۳۷٦): هماتولوژی و بیوشیمی بالینی پرندگان، (گردآوری و تدوین) چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز، شیراز، شماره ۲۷۲: صفحه ۹۰.

6- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H., Liufu, Z., (2006): Effects of dietary Vitamin C on Survival, growth and Immunity of large Yellow Croaker, Pseudosciaena crocea,. Aquaculture 261:327-336.

7- Chen, X., Z.Wu. Z. Yin and J. Li. L., (2003): Effects of four species of herbs on immune function of Carassius auratus gibelio. Journal of Fish Sciences of China, 10: 36–40

8- Dabrowski, K., (2001): Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC press. 288p.

9- Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, C.L., Cahu, J.L., Zambonino-Infante., (2011): Overview of Vitamin D and C requirements in fish and their influence on the Skeletal system . Aquaculture 315: 49-60.

10- Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Le Gall, M.M., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., (2011): Imbalanced dietary Ascorbic acid alter molecular pathways involved in Skeletogenesis of developing European sea Bass(Dicentrarchus labrax, Linnaeus, 1758). Comparative Biochemistry and Physiology Part A. doi: 10.106/j.cbpa.2011.01.013.

11- Feldman, B.F., Zinkl J.G. and Jain N.C., (2000): Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins: pp 1120-1124.

12- Garcia, F., Pilarski F., Onaka E.M., Moraes F.R., Martins M..L., (2007): Hematology of piaractus mesopotamicus fed diets supplemented with vitamins C & E, challenged by Aeromonas hydrophila article of Aquaculture, 271: .39-46.

13- Iwama, G, Nakanishi T., (1996): The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish, pp: 73-114.

14- Jain, J., Wu, Z., (2004): Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (Cyprinus carpio var. Jian). Fish and Shellfish Immunology, 16 : 185-191.

15- Jain, J., Wu Z., (2003): Effect of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker Psedcosciaena crocea (Richardson) Aquaculture, 218: pp. 1-9.

16- Kajita, Y., M. Sakai S., Atsuta, M., (1990): The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Fish Pathology, 25:93-98.

17- Khaksary Mahabady, M., Ranjbar, R., Arzi, A., Papahn, A. A., Najafzadeh, H. A., (2006): comparison study of effects of Echinacea extract and levamisole on phenytoin-induced cleft palate in mice. Regulatory toxicology pharmacology;46: 163-166.

18- Li, M. H., Robinson, E. H., (1999): Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. Journal of Applied Aquaculture 9(2): pp 53-79.

19- Marian, M.P., (2004): Growth and immune response of juvenile greasy groupers (Epinephelus tauvina) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against Vibrio harveyi infections Aquaculture, 237: pp. 9-20.

20- Moreau, R., Dabrowski, K., Sato, P. H., (1999): Renal L-gulono- 14- lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (Acipenser fulvescens). Aquaculture 180: pp 250-257.

21- -Muntro, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S. , Robaina, L., Vergara, J.M., Tort, L., (1998): Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream_Sparus aurata/ juveniles subjected to crowding stress, Aquaculture 171 _1999: 269–278.

22- National Academy Press, Washington, DC. 114p. National Research Council. (1993): Nutrient requirement of fish.

23- Osserman, E.F., Lawlor, D.P. (1966), Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. 124:921–951.

24- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto , T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., (2004): Nonspecific immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. Fish & Shellfish Immunology 16: 25–39.

25- Røed K. H., Fjalestad, K.T., Strømsheim, A., (1993): Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (Salmo salar). Aquaculture, 114: 19– 31.

26- Sakai, M., (1999): Curent Research status of fish immunostimulant. J. Aquaculture, 172: 63-92.

27- Selvaraj V., Sampath K. , Sekar V., (2005): Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (Cyprinus carpio) infected with Aeromonas hydrophila. Fish & Shellfish Immunology 19: 293-306.

28- Swain, P, S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K. , Meher, N., (2006): Non-specific

immune parameters of brood Indian major carp Labeo rohita and their seasonal variations. Fish & Shellfish Immunology 22 (2007): 38–43.

29- Thrall, M.A., (2004): Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp: 241, 277-288, 402.