مقایسه اثر لوامیزول، هیدروکلراید و ارگوسان بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

*هما علمداری[۱]، مجتبی علیشاهی[۲]، مهران جواهری[۳] و عین‌اله گرجی‌پور[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات خوزستان، ایران، [۲]استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، [۳]استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، ایران، [۴]دانشیار مرکز تحقیقات ماهیان سردابی، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/۱٤

چکیده

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری برای کنترل بیماری‌ها دارای اثرات زیان‌باری است که تلاش برای یافتن جایگزین‌های مناسب این مواد را گریزناپذیر نموده است. در این پژوهش تأثیر تجویز خوراکی پودر ارگوسان و لوامیزول بر فاکتورهای خونی و تحریک ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. ٤٥٠ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به ۳ گروه و هر گروه در ۳ تکرار تقسیم گردیدند. تیمار اول، ماهی تغذیه شده با خوراک شامل پودر لوامیزول و تیمار دوم، تغذیه شده با خوراک شامل پودر ارگوسان و تیمار شاهد که با غذای معمولی تغذیه گردیدند. تیمارها به‌مدت ٦۰ روز با خوراک‌های تجربی تغذیه شدند. زیست‌سنجی در روز صفر، ۳۰ و ٦۰ صورت گرفته و شاخص‌های رشد (ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی و بازده پروتئین جیره) بین تیمارهای مقایسه گردید. در انتهای دوره نمونه خون از تیمارها تهیه و فاکتورهای خون‌شناسی (تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت و اندیس‌های گلبولی MCV، MCH، MCHC و ایمنی‌شناسی (فعالیت لایزوزیم سرم، اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم) مقایسه گردید. نتایج نشان داد که بیش‌تر فاکتورهای رشد در گروه تغذیه شده با ارگوسان و لوامیزول نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (P<۰/۰۵). میزان فعالیت لایزوزیم سرم نیز افزایش معنی‌داری در تیمار تغذیه شده با لوامیزول نشان داد (P<۰/۰۵) هر چند این افزایش در مورد تیمار تغذیه شده با ارگوسان معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بر خلاف افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار ارگوسان و لوامیزول نسبت به تیمار شاهد، این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). فاکتورهای خونی ماهیان در تمام تیمارها بعد از ٦۰ روز تغذیه با جیره‌های آزمایشی بدون تفاوت معنی‌دار بودند (P>۰/۰۵). به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که ارگوسان و لوامیزول قادر به بهبود شاخص‌های رشد و برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلا می‌باشند و بنابراین می‌تواند در پرورش ماهی قزل‌آلا برای تحریک رشد و ایمنی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، ارگوسان، لوامیزول، شاخص‌های رشد، پاسخ ایمنی

مقدمه

با توجه به تکامل بیش‌تر ایمنی غیراختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان برتری بیش‌تری نسبت به حیوانات خون‌گرم دارد (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹٦). به همین دلیل اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی به‌منظور افزایش قدرت ایمنی، ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها و بهبود فاکتورهای رشد کاربرد زیادی یافته است (Yuan و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی، عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد

* مسئول مکاتبه: homa_alamdari@yahoo.com

باکتری‌های مقاوم و مقاومت‌های باکتریایی، مشکلات زیست‌محیطی، تخریب باکتری‌های فلـور آب و روده، گرانی و مشکلات اجرایی تجویز باعث گرایش بیش‌تر به استفاده از محرک‌های ایمنـی بـه‌عنـوان جـایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (Raa، ۱۹۹٦).

در پژوهش‌های مختلـف اثـرات تحریـک ایمنـی بسیاری از محرک‌های ایمنی گـزارش گردیـده اسـت (Sakai، ۱۹۹۹). لوامیزول ابتدا به‌عنـوان یـک داروی ضدانگلی معرفی گردید، ولی امروزه از آن به‌عنوان یک ایمونوادجوانت[1] نیز یاد می‌شود (Alvarez-Pellitero و همکاران، ۲۰۰٦). در حوضچه‌ها و مخازن پرورشی استفاده از حمام دارویی، داروی لوامیزول باعث کاهش تلفات در گونـه تـاس‌مـاهی ایرانـی در دوران لاروی (بهرام و همکاران، ۱۳۸٤) و با دوز خوراکی $5\ mg/L_5$ در بچه تاس‌ماهی ایرانی (وهاب‌زاده‌رودسری، ۱۳۸۲) نـرخ مـرگ و میـر را کـاهش داده و در نهایـت نـرخ بازماندگی را افزایش داد. همچنین اثرات تحریک ایمنی به‌دنبال تجویز لوامیزول به روش‌های مختلف، در ماهی کپـور معمـولی (Gopalakannan و Arul، ۲۰۰٦)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Ispir و Doruee، ۲۰۰۵)، سیم سرطلایی (Mulero و همکاران، ۱۹۹۸)، گربـه‌مـاهی (Kumari و Sahoo، ۲۰۰۵)، سـپرماهی (Alvarez-Pellitero و همکاران، ۲۰۰٦) و سایر ماهی‌ها، گزارش گردیده است. به‌طوری‌که امروزه اسـتفاده از ایـن دارو برای تحریک رشد و ایمنی ماهی رایج گردیده اسـت (Alvarez-Pellitero و همکاران، ۲۰۰٦).

ارگوسان یک محصول جلبکی (به‌دست آمده از جلبک لامیناریا دیجیتاتا[2]) است که شامل حدود ۱ درصد آلجینیک اسید[3] و ۹۹ درصد مواد شامل جلبکی می‌باشد. نقش آن در تحریک ایمنی و رشد ماهی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌ها در گزارش‌های مختلف آورده شده است (Gioacchini و همکاران، ۲۰۰۸). آلجینیک اسید پلی‌ساکاریدی است که از دو نوع یورونیک اسید تشکیل شده است (Ertsvag و Valla، ۱۹۹۸). افزودن ۰/۵ درصد ارگوسان در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) باعث افزایش شاخص‌های رشد و بازماندگی در ماهیان تیمار ارگوسان در مقایسه با تیمار شاهد شده است (فغانی، ۱۳۸۵). همچنین استفاده از ارگوسان به‌میزان ۰/۵ درصد در جیره غذایی پست لارو میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) باعث افزایش فاکتورهای رشد و میزان بازماندگی و مقاومت در برابر تنش‌های (شوری و فرمالین) در تیمار ارگوسان در مقایسه با تیمار شاهد شده است (بحری، ۱۳۸٦). Gioacchini و همکاران (۲۰۰۸) تظاهر بیش‌تر برخی ژن‌های مربوط به پاسخ ایمنی و کاهش میزان کورتیزول سرم ماهی را به‌دنبال تجویز ارگوسان گزارش نمودند (Divyagnaneswari، ۲۰۰۷). Peddie و همکاران (۲۰۰۲) در ماهی قزل‌آلا (Nussler و Thompson، ۱۹۹۲) و Heidarieh و همکاران (۲۰۱۰) در میگو اثر تحریک ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی را به‌دنبال استفاده از ارگوسان گزارش نمودند.

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از خانواده آزاد ماهیان (*Salmonidae*) است و در میان آزادماهیان، این گونه تنها گونه‌ای است که برای پرورش بسیار مناسب تشخیص داده شده است. از آن‌جا که ماهی قزل‌آلا به‌عنوان یکی از ماهی‌های باارزش اقتصادی بالا و تنها گونه سردابی پرورشی در صنعت آبزی‌پروری کشور می‌باشد، تلاش در افزایش قدرت ایمنی این مـاهی در برابر بیماری‌های گوناگون به‌خصوص بیماری ناشناخته چندین سال اخیر این گونه که تلفات شدیدی را ایجاد نموده است اهمیتی ویژه دارد.

در این پژوهش با توجه به گزارش‌هـای گونـاگون بهبود فاکتورهای رشد و تحریک پاسخ ایمنـی توسـط لوامیزول و ارگوسان در آبزیان، سعی شد اثـر ایـن دو محرک ایمنی را که در ماهی قزل‌آلا کم‌تر مورد توجـه بوده است، بررسی گردد.

1- Immunoadjuvant
2- Labiatae
3- Algal-Based Product Containing Alginic Acid

مواد و روش‌ها

ماهی‌ها و شرایط آزمایش: پژوهش به‌مدت ۸ هفته در مرکز ایستگاه تحقیقات ماهیان سردابی شهید مطهری واقع در ۲۵ کیلومتری جنوب شهر یاسوج انجام شد. به‌منظور اجرای این پژوهش تعداد ۹ تانک فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری در داخل یک سالن سرپوشیده مستقر شدند. آب از طریق یک لوله وارد سالن شده و سپس از طریق انشعابات بعدی به‌طور مساوی بین تانک‌ها با جریان ۵ لیتر در دقیقه تقسیم شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در پژوهش به قرار زیر بود. دما: ۱۴-۱۲ درجه سانتی‌گراد؛ اکسیژن محلول: ۸/۷ ppm؛ pH: ۸/۸؛ NO_2<۰/۰۲ ppm؛ NH_3<۰/۱ ppm و میزان تعویض هفتگی آب ۵۰ درصد حجم آب بود.

تعداد ۴۵۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۰/۵۴±۲۵ گرم پرورش‌یافته در سالن پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج استفاده گردید (شفایی‌پور، ۱۳۸۵) که به تعداد ۵۰ عدد به هر تانک فایبرگلاس معرفی شد. به‌منظور سازگاری ۱ هفته از غذای تجاری تغذیه شدند بعد از طی شدن مرحله سازش‌یابی ماهی‌ها به شکل کاملاً تصادفی به‌صورت زیر بین ۹ وان ۲۵۰ لیتری تقسیم گردیدند.

تیمار A تغذیه شده با خوراک بدون محرک ایمنی؛

تیمار B تغذیه شده با خوراک شامل محرک ایمنی ارگوسان (۰/۲)؛

تیمار C تغذیه شده با خوراک شامل محرک ایمنی لوامیزول هیدروکلراید (۰/۶)،

پورد لوامیزول هیدروکلراید یک مشتق ایمیدازول تیازول سنتتیک ساخت شرکت ابوریحان در پژوهش استفاده گردید.

همه تیمارها با خوراک‌های مخصوص هر گروه به‌مدت ۸ هفته و با توجه به اشتهای ماهی‌های هر تیمار (براساس جدول‌های استاندارد غذادهی ماهی قزل‌آلا) تغذیه گردیدند.

بعد از مرحله سازگاری جیره آزمایشی جایگزین جیره تجاری شد. جیره ۳ نوبت صبح، عصر و شب به ماهیان داده شد. تغییر میزان غذای مصرفی هر ۱۵ روز یک‌بار با انجام عملیات زیست‌سنجی و با توجه به دمای آب مشخص می‌شد (Webster و همکاران، ۱۹۹۷). درجه حرارت، pH و اکسیژن محلول در آب هر روز قبل از هر نوبت غذادهی اندازه‌گیری شد.

تهیه خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول: برای ساخت غذا ابتدا ترکیبات جیره‌های شامل ارگوسان (۰/۲ میلی‌گرم) و لوامیزول (۰/۶ میلی‌گرم) وزن‌کشی شدند که انتخاب دوز هر ماده براساس پژوهش‌های انجام شده در منابع و مؤلفین در سایر ماهی‌ها انتخاب گردید (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱). سپس محرک‌های ایمنی به‌طور جداگانه با غذای کنسانتره GFT-1 بچه‌ماهی آسیاب شده، مخلوط شدند و پس از افزودن آب مقطر به آن‌ها خمیر به‌دست آمده توسط چرخ گوشت صنعتی به‌صورت پلت ۲/۵ میلی‌متر تبدیل شد. این پلت‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس بسته‌بندی شدند.

آزمایش‌های انجام شده روی نمونه‌ها: وزن ماهی‌ها در هر تیمار در ابتدای پژوهش اندازه‌گیری شد. بعد از تغذیه تیمارها با خوراک‌های مشخص شده به‌مدت ۸ هفته، تعداد تلفات ماهی در طول پژوهش و وزن نهایی ماهی‌ها نیز ثبت گردید، میزان خوراک مصرفی هر تیمار نیز ثبت گردید.

اندازه‌گیری اندیس‌های رشد و ضریب تبدیل غذایی: بعد از اتمام دوره پرورش و مشخص شدن وزن نهایی، وزن خوراک مصرف شده فاکتورهای درصد افزایش وزن[1]، فاکتور وضعیت[2]، افزایش طول[3]، ضریب تبدیل غذایی[4] (Divyagnaneswari و همکاران، ۲۰۰۷)، ضریب رشد ویژه[5]، نسبت بازده پروتئین[6]، کارایی غذا[7]، زیر در هر تیمار مشخص و ثبت گردید.

1- Percentage Weight Gain
2- Length Gain condition Factor
3- Length Gain
4- Feed Conversation Ratio
5- Specific Growth Ratio
6- Protein Efficiency Ratio
7- Feed Efficiency

$$PWG=\frac{[\text{متوسط وزن اولیه (گرم)}-\text{متوسط وزن نهایی (گرم)}]}{\text{متوسط وزن اولیه (گرم)}}\times ۱۰۰ \quad (۱)$$

$$CF=(W/L^{۳})\times ۱۰۰ \quad (۲)$$

$$LG=\text{میانگین طول اولیه} - \text{میانگین طول ثانویه} \quad (۳)$$

$$FCR=\frac{\text{مقدار غذای خورده شده به گرم}}{\text{افزایش وزن بدن به گرم}} \quad (٤)$$

$$SGR=\frac{Lnw_{۲}-Lnw_{۱}}{D}\times ۱۰۰ \quad (۵)$$

$$PER=\frac{\text{افزایش وزن بدن (گرم)}}{\text{وزن پروتئین مصرفی (گرم)}} \quad (٦)$$

$$FE=\frac{\text{افزایش وزن ماهی (گرم)}}{\text{وزن غذای خشک خورده شده (گرم)}}\times ۱۰۰ \quad (۷)$$

اندازه‌گیری پارامترهای خونی: در انتهای دوره از هر مخزن از ۵ ماهی خون‌گیری شده و برای اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی نمونه‌ها از همان روش‌های معمول و متداول برای اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی پستانداران با تغییراتی استفاده گردید (Webster و همکاران، ۱۹۹۷). برای اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین، برای اندازه‌گیری هماتوکریت یا حجم فشرده گلبولی[1] از روش میکروهماتوکریت و شمارش کلی گلبول‌های قرمز[2] و گلبول‌های سفید[3] به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار انجام شد. اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید.

$$MCV=\frac{\text{هماتوکریت (درصد)}\times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌مترمکعب)}} \quad (۸)$$

$$MCHC=\frac{\text{هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)}\times ۱۰}{\text{هماتوکریت (درصد)}} \quad (۹)$$

$$MCH=\frac{\text{هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)}\times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌مترمکعب)}} \quad (۱۰)$$

آزمایش‌های ایمنی انجام شده روی نمونه‌ها

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت[4] توصیه شده توسط Osserman و Lawlor (۱۹۹٦) و Røed و همکاران (۱۹۹۳) با مقداری تغییرات استفاده گردید.

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات استفاده گردید.

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات پژوهش از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون روش تی- استیودنت[5] برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از هموژنیتی انحراف معیار اطلاعات، از آنوای یک‌طرفه برای بررسی تفاوت میانگین فاکتورهای مورد بررسی تیمارهای ارگوسان، لوامیزول و شاهد استفاده گردید.

برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست چنددامنه‌ای دانکن[6] در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

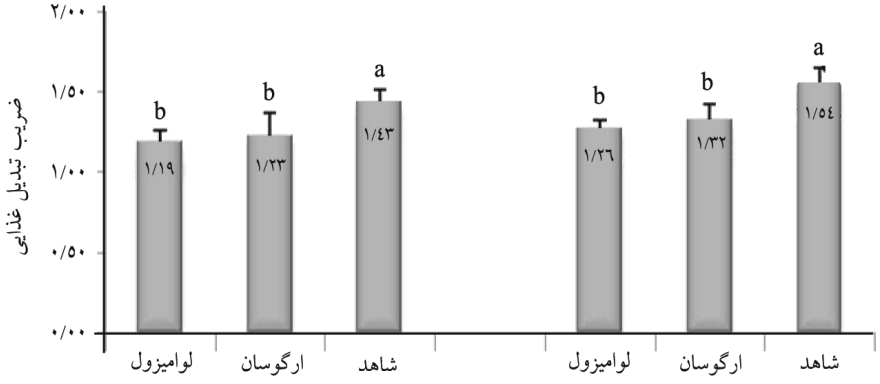
نتایج مربوط به مقایسه فاکتورهای رشد در دو تیمارهای مورد مطالعه در جدول ۱ و شکل‌های ۱ تا ٦ آورده شده است.

1- Packed Cell Volume (PCV)
2- Total Red Blood Cell
3- Total White Blood Cell Count
4- Agarose Lysoplate Method
5- Leven Statistic Test
6- Duncan

جدول ۱- زیست‌سنجی تیمارهای ارگوسان و لوامیزول و شاهد در ابتدا، میان‌دوره و انتهای دوره (میانگین ± انحراف معیار) تعداد نمونه ۲۵ قطعه در هر گروه (علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ است)

زیست‌سنجی تیمارها	لوامیزول	ارگوسان	شاهد
وزن اولیه (گرم)	۲۷/۰۹±۳/۳۸	۲۵/۸۲±٤/۰۸	۲٤/۲٦±٤/۹۸
طول اولیه (سانتی‌متر)	۱٤/٤۲±۰/٥٤	۱٤/۱۲±/۹۰	۱۳/۸۸±۰/۸۸
وزن میان‌دوره (گرم)*	٤۹/۸٦±٥/۹٥*	٤۸/٦۱±٦/٦٤*	٤۲/۳۳±۷/۹٤
طول میان‌دوره (سانتی‌متر)*	۱٥/۱٥±۰/۷٦*	۱٥/۰۱±۰/۸٤	۱٤/٥۰±۰/۹۱
وزن نهایی (گرم)*	۸۲/٦۹±۹/۰۰*	۸۰/۱۸±۱۰/۸۲*	٦٤/٤۱±۹/٦۹
طول نهایی (سانتی‌متر)*	۱۸/۳٤±۱/۰۸*	۱۸/۱٦±۱/۳۰	۱۷/۳۰±۱/۱٥
افزایش وزن میان‌دوره (گرم)	۳٥/٤٦±۲/۲۸*	۳٤/٥۰±۳/۷۹*	۲۸/٤٥±۱/۷۳
افزایش طول میان‌دوره (سانتی‌متر)	۰/۷۷±۰/۰۹*	۰/۹۰±۰/۳۳*	۰/٦۲±۰/٤٦
افزایش وزن نهایی (گرم)	٥٤/۱۷±٤/٦٥*	٥۳/۲۳±٤/۰٥*	٤۰/٤۹±۲/۳۸
افزایش طول نهایی (سانتی‌متر)	۳/۹۳±۰/۱۸*	٤/۰٥±۰/٤۹	۳/۳٤±۰/٤۹*

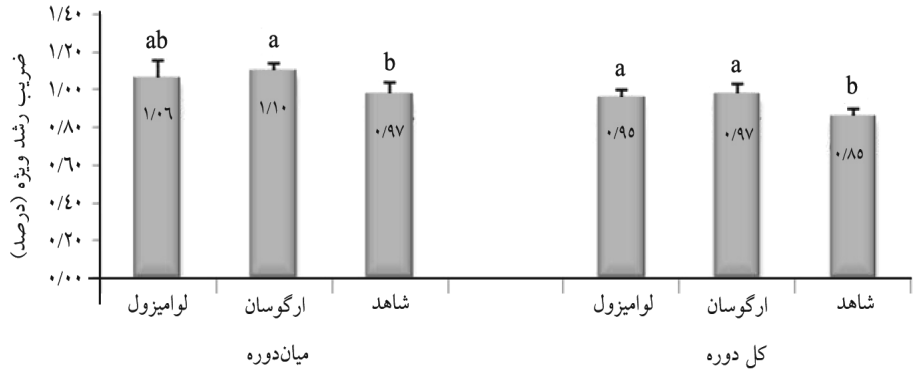
زیست‌سنجی آخر دوره در مقایسه با زیست‌سنجی ابتدای دوره مقایسه گردیده و همان‌طورکه در جدول ۱ مشخص است، هم میانگین وزن و طول ماهی‌ها در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل لوامیزول و ارگوسان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد است ($P<۰/۰٥$). همچنین کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار لوامیزول در میان‌دوره و بیش‌ترین ضریب تبدیل در گروه شاهد پایان دوره مشاهده گردید. ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمار لوامیزول و ارگوسان مشاهده نگردید ($P>۰/۰٥$). همان‌طورکه در شکل ۱ مشخص است در هر دو مرحله میان‌دوره و پایان دوره پرورش ضریب تبدیل غذایی در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد.



شکل ۱- مقایسه ضریب تبدیل غذایی بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

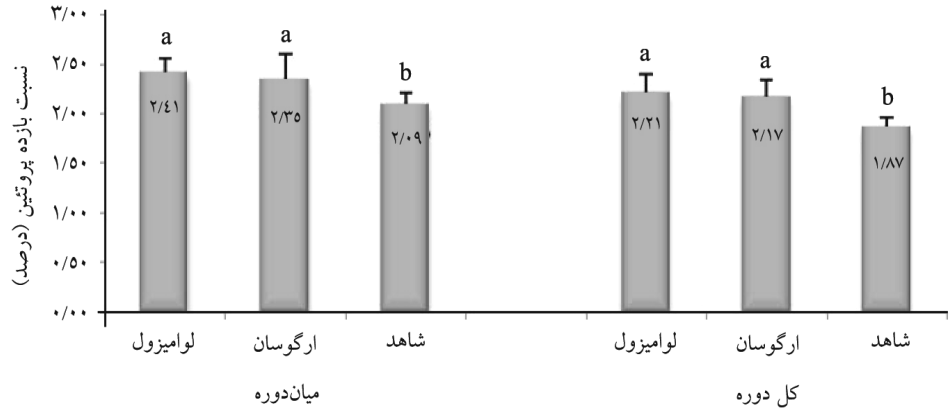
بالاترین ضریب رشد (۱/۱۰±۰/۰٤) را در طول دوره پرورش نشان داد. ضریب رشد ویژه در تیمار لوامیزول نیز افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P<۰/۰٥$).

نتایج مربوط به ضریب رشد ویژه گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۲ آورده شده است. تیمار تغذیه شده با خوراک شامل غذای معمولی دارای پایین‌ترین ضریب رشد ویژه (۰/۸٥±۰/۱۰) می‌باشد.



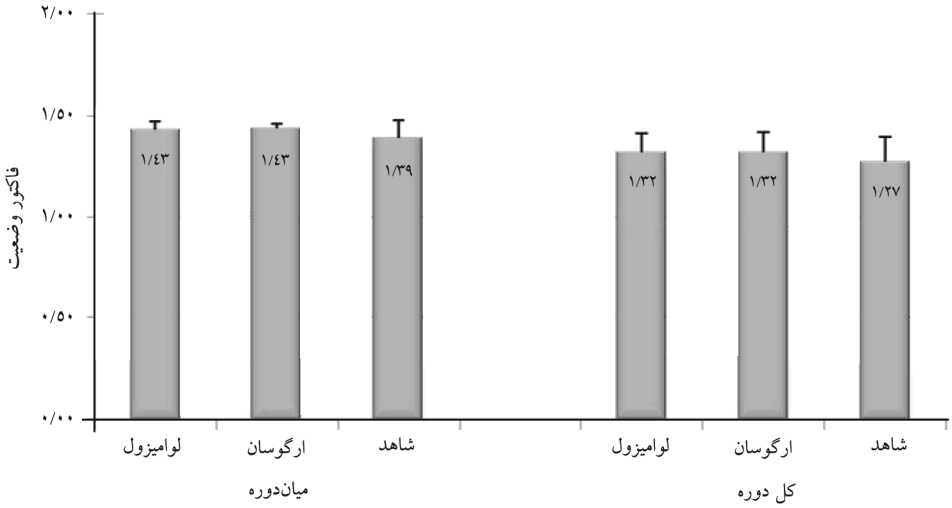
شکل ۲- مقایسه ضریب رشد ویژه بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

نتایج مربوط به نسبت بازده پروتئین در شکل ۳ آورده شده است. داده‌های شکل نشان می‌دهد که در هر دو مرحله میان‌دوره و پایان‌دوره پرورش نسبت بازده پروتئین در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد. به‌طوری‌که بیش‌ترین بازده پروتئین در تیمار لوامیزول میان‌دوره (۰/۱٦±۲/٤۱) و سپس در تیمار ارگوسان میان‌دوره (۰/۲٦±۲/۳۵) مشاهده گردید. در صورتی‌که کم‌ترین میزان نسبت بازده پروتئین در تیمار شاهد کل دوره (۰/۱۰±۱/۸۷) مشاهده گردید.



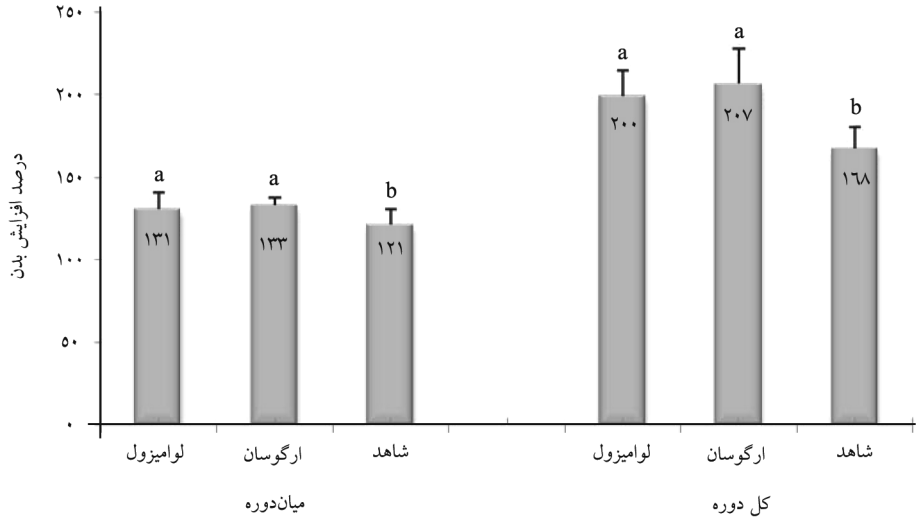
شکل ۳- مقایسه نسبت بازده پروتئین بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

نتایج مربوط به شاخص وضعیت تیمارهای مورد بررسی در شکل ٤ آورده شده است. نتایج نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در میان‌دوره و پایان‌دوره بود به‌طوری‌که شاخص وضعیت در تمام تیمارها در محدوده ۱/٤۳-۱/۲۷ درصد بود.



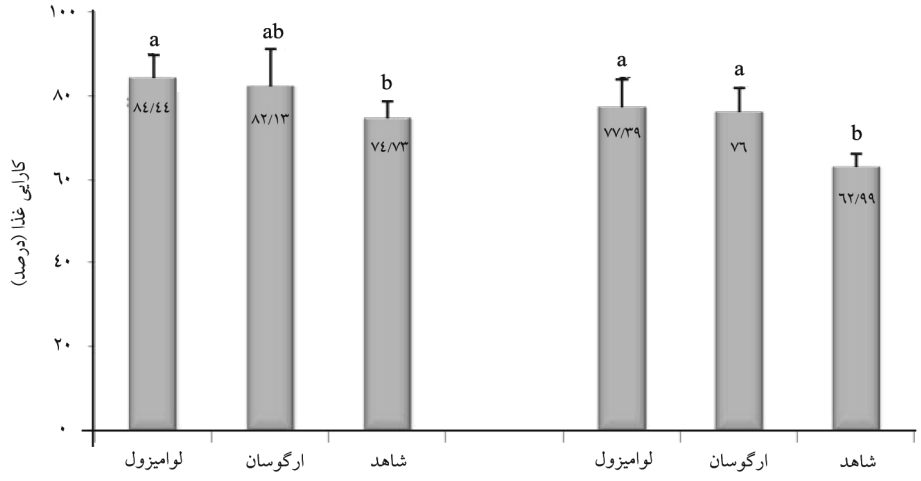
شکل ٤- مقایسه فاکتور وضعیت بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق

نتایج مربوط به درصد افزایش وزن در شکل ۵ آورده شده است. در هر دو مرحله میان‌دوره و پایان‌دوره پرورش درصد افزایش وزن در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد.



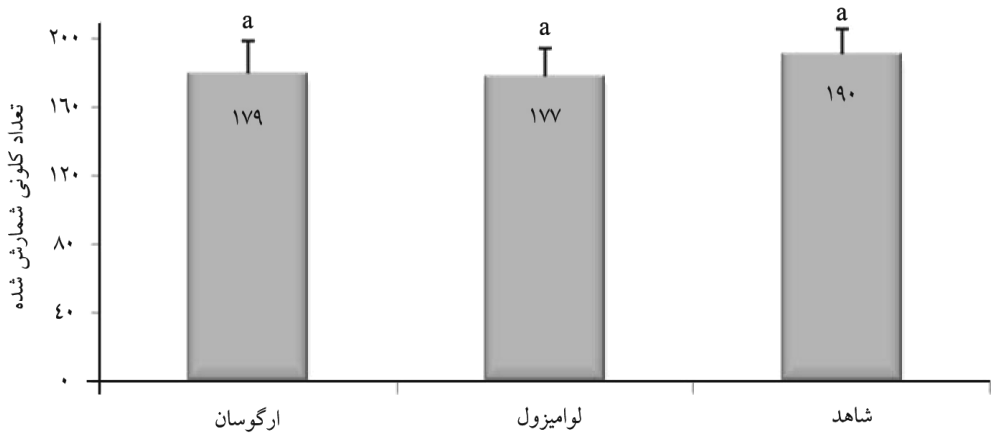
شکل ۵- مقایسه درصد افزایش وزن بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

نتایج مربوط میزان کارایی غذا در شکل ٦ آورده شده است. میزان کارایی غذا در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل لوامیزول در میان‌دوره (۸٤/٤٤±۵/٤۳) و پایان‌دوره (۷۷/۳۹±٦/٦٤) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد (P<۰/۰۵). ولی کارایی غذا در تیمار ارگوسان فقط در پایان‌دوره (۷٦/۰٤±۵/۷۹) تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد (٦۲/۹۹±۳/٤۰) نشان داد (P<۰/۰۵).



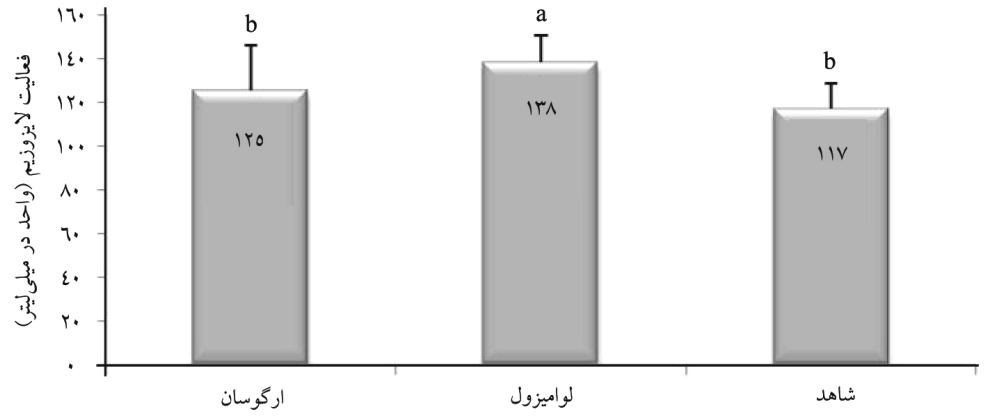
شکل ٦- مقایسه کارایی غذا بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ۳۰ و ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

تعداد کلونی‌های شمارش شده بدون تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد بررسی بود (P<۰/۰۵)، ولی بیش‌ترین تعداد باکتری شمارش شده در تیمار شاهد (۱۹۰/۸±۱۵/۰۸۴۳٤) و کم‌ترین تعداد باکتری شمارش شده در تیمار لوامیزول (۱۷۷/۹۳۳۳۳۳±۱٦/۹۷۲۵۳) مشاهده گردید.



شکل ۷- مقایسه قدرت باکتری‌کشی سرم بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ٦۰ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

داده‌های شکل ۸ گویای این واقعیت است که تغذیه با خوراک شامل لوامیزول باعث افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم سرم گردیده است ولی لوامیزول بر خلاف افزایش ظاهری فعالیت لایزوزیم، این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵). پایین‌ترین فعالیت لایزوزیم معادل (۱۱۷±۱۲/۰٤۱۵۹) در ماهیان تغذیه شده با تیمار شاهد و سپس به‌ترتیب در تیمارهای ارگوسان و لوامیزول مشاهده می‌شود.



شکل ۸- مقایسه فعالیت لایزوزیم بین تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان، لوامیزول و تیمار تغذیه شده با خوراک معمولی (بدون محرک ایمنی) در روز ٦٠ تحقیق (حروف نامتشابه در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار است)

نتایج بررسی‌های خون‌شناسی نمونه‌های اخذ شده از تیمارهای ارگوسان و لـوامیزول در جـدول ۲ آمـده است. نتایج نشان داد حجم فشرده گلبـولی (PCV) و تعـداد گلبـول‌هـای قرمـز و میـزان هموگلـوبین و نیز انـدیس‌هـای گلبـولی MCV، MCH و MCHC تحـت‌تـأثیر تجـویز خـوراکی ارگوسـان و لـوامیزول هیدروکلراید قرار نگرفت (P>۰/۰۵). این نتایج بیانگر تـأثیر نداشـتن ارگوسـان و لـوامیزول در فاکتورهـای خونی گلبول‌های قرمز است.

جدول ۲- نتیجه اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی تیمارهای مورد آزمایش * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با گروه کنترل می‌باشد)

فاکتورهای خون شناسی	لوامیزول		ارگوسان		شاهد	
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین
هماتوکریت (PCV)	۵/۳۱	۳۲/٤۲	۵/۲٤	۳۲/۷۳	۳/۳٤	۳٤/۸
هموگلوبین (Hb)	۰/۷۲	٦/۵۷	۰/۵۳	٦/۸۱	۰/٦۵	٦/۷٤
10^3× تعداد گلبول‌های سفید WBC	۳/۳۱	۱۵/٦۷	۱/۷۵	۱٤/۲٦	۱/۷۷	۱٤
10^6× تعداد گلبول‌های قرمز RBC	۰/۱۰	۱/۰٦۳	۰/۰۷	۱/۰۳٦	۰/۱۳	۱/۰۷
حجم متوسط گلبولی MCV (فمتولیتر)	۹۸/۲۵	۳۰۵/۱۳	۵۸/۱٦	۳۱۷/۹۵	٤۸/۱۹	۳۲۸/۱۰
وزن متوسط هموگلوبین گلبولی MCH (پیکوگرم)	۸/٦۵	٦۲/۳۰۲	٦/۸۷	٦٦/۰۲	۱۲/۸٤	٦٤/۰۰۱
نسبت هموگلوبین گلبولی MCHC (درصد)	۳/۹۱	۲۰/۵۲٦	۳/۸۹	۲۱/۳٤	۱/۹۷	۱۹/٤۷

بحث و نتیجه‌گیری

تأثیر دو محرک ایمنی ارگوسان و لوامیزول هیدروکلراید در تحریک رشد، ایمنی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های مختلف در گزارش‌های گوناگون تأیید شده است (Raa، ۱۹۹٦). در این پژوهش نیز مشخص گردید تقریباً تمام فاکتورهای رشد مورد بررسی نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن، نسبت بازده پروتئین در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول در هر دو مرحله نمونه‌گیری (میان‌دوره و پایان‌دوره) افزایش معنی‌داری

نسبت به تیمار شاهد یافت (P<۰/۰۵). ولی تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های تیمارهای تغذیه شده با ارگوسان و لوامیزول نبود (P>۰/۰۵). با توجه به گزارش‌های مختلف از تحریک رشد و ایمنی متعاقب تجویز ارگوسان می‌توان ادعا نمود که محرک ایمنی لوامیزول نیز اثرات مشابه این ماده در ماهی قزل‌آلا دارد. گزارش مشابهی از بررسی اثر این ماده در تحریک رشد ماهی در منابع مختلف آمده است (Alvarez-Pellitero، ۲۰۰۶). بنابراین مشاهده می‌شود که ارگوسان و لوامیزول می‌تواند اثر مثبتی روی کارآیی رشد آبزیان داشته باشد. این وضعیت احتمالاً ناشی از اثراتی است که ارگوسان روی سوخت و ساز بدن وارد می‌سازد. در همین رابطه نوسلر و تامپسون عنوان کردند که محرک‌های ایمنی باعث افزایش سوخت و ساز بدن نیز می‌شوند که بدین طریق میزان جذب غذا و کارایی آن افزایش یافته است (Nussler و Thompson، ۱۹۹۲). کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول نسبت به گروه شاهد (در هر دو مرحله نمونه‌گیری) مشاهده گردید (P<۰/۰۵). هر دو فاکتور ایمنی مورد بررسی یعنی فعالیت لایزوزیم و قدرت باکتری‌کشی سرم تحت‌تأثیر تجویز ارگوسان و لوامیزول در خوراک قرار گرفت، به‌طوری‌که میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). هر چند قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار تغذیه شده با خوراک شامل ارگوسان و لوامیزول افزایش نشان داد، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). به‌طورکلی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار ارگوسان و لوامیزول در فعالیت لایزوزیم و قدرت باکتری‌کشی سرم مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). در این پژوهش 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 می‌نماید. گزارش‌های مشابهی از تجویز محرک‌های ایمنی در ماهی کپور معمولی آمده است که این نتایج با یافته‌های این پژوهش هم‌سو و هم‌جهت می‌باشد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). براساس نتایج حجم فشرده گلبولی (PCV) و تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین و نیز اندیس‌های گلبولی MCV، MCH و MCHC هیچ‌کدام تحت‌تأثیر تجویز خوراکی لوامیزول و ارگوسان قرار نگرفت (P>۰/۰۵). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر نداشتن لوامیزول و ارگوسان در شاخص‌های خونی مربوط به گلبول‌های قرمز می‌باشد. به‌عبارت دیگر بر خلاف تحریک رشد و ایمنی به‌دنبال تجویز خوراکی لوامیزول و ارگوسان، به‌صورت معکوس، کاربرد ارگوسان و لوامیزول تأثیری روی کارآیی فعالیت هماتوپوئتیک (خون‌سازی) و نیز میزان تخریب گلبولی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نداشت، به‌طوری‌که برخی از پژوهش‌گران نیز بی‌تأثیر بودن کاربرد محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژیک ماهی را گزارش نمودند (Sakai، ۱۹۹۹). البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد به‌ویژه ماهی بر خلاف حیوانات خون‌گرم به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر فاکتورهای مختلف، مثل استرس، دما، فصل، تغذیه و... قرار گرفته و تابلوی خوبی برای بررسی وضعیت سلامت یا ایمنی ماهی به‌شمار نمی‌رود (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). با توجه به گزارش‌هایی از تأثیر سوء برخی محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای خونی و القای کم‌خونی در ماهی می‌توان با توجه به نتایج این پژوهش ادعا نمود که لوامیزول وارگوسان تأثیر سویی بر فعالیت خون‌سازی ماهی و نیز طول عمر گلبول‌های قرمز ندارند.

بر خلاف نداشتن تأثیر بر گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار لوامیزول و ارگوسان افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. از آن‌جا که گلبول‌های سفید خونی، به‌ویژه لنفوسیت‌های B و T نقش عمده‌ای در سیستم دفاعی ماهی دارند، تغییر تعداد این سلول‌ها تحت‌تأثیر محرک‌های ایمنی منطقی به‌نظر می‌رسد. از طرفی بسیاری از مواد هومورال غیراختصاصی سیستم ایمنی ماهی توسط گلبول‌های سفید خونی ترشح می‌شوند، که افزایش این فاکتورهای هومورال تحت‌تأثیر افزایش تعداد لکوسیت‌های خونی بوده است. افزایش تعداد گلبول‌ای سفید خونی در عفونت‌های طبیعی و تجربی و در مواقع استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی گوناگون گزارش شده است (Marian، ۲۰۰٤).

مواد موجود در ارگوسان، مثل آلجینیک‌ها برای افزایش انتقال اکسیژن از غشای سلولی لنفوسیت‌های ماهی را باعث می‌شوند که این فعالیت متابولیکی افزایشی منجر به افزایش مقاومت در برابر بیماری و تسریع در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده می‌گردد (Nussler و Thompson، ۱۹۹۲).

براساس یافته‌های این پژوهش می‌توان ادعا نمود که ارگوسان و لوامیزول در روش خوراکی باعث بهبود بیش‌تر فاکتورهای رشد مورد بررسی گردیده و ایمنی غیراختصاصی را نیز در ماهی قزل‌آلا تحریک نموده‌اند، ولی بر فاکتورهای خونی وابسته به گلبول‌های قرمز بی‌تأثیر بوده و افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را باعث شده‌اند. همچنین تفاوت معنی‌داری بین این دو ماده در فاکتورهای مورد بررسی مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان از این دو ماده به‌عنوان محرک رشد و ایمنی در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای کشور استفاده نمود، البته تجویز این دو ماده در شرایط کارگاه پرورش نیاز به پژوهش بیش‌تر و استانداردسازی روش تجویز و میزان تجویز دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولان و کارشناسان، محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج تقدیر به‌عمل آورده و از همکاری بخش بیماری‌های ماهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز نیز سپاسگزاری نمایند.

منابع

۱- بحری، ا.، ۱۳۸٦. بررسی اثرات جداگانه و توأم ارگوسان و ویبرو ماگس به‌عنوان افزایش‌دهنده فاکتورهای رشد و ایمنی و زنده‌مانی در پست لاروهای میگوی سفید هندی. رساله دکتری شیلات دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات. ۱۰۸ صفحه.

۲- بهرام، س.، رودسری، ح.، نظری، ر.، و جوادیان، ر.، ۱۳۸٤. تأثیر داروی لوامیزول بر میزان بازماندگی نوزادان تاس‌ماهی ایرانی. مجله علوم دریایی ایران، دوره ٤، شماره ۱ و ۲.

۳- شفایی‌پور، ا. ۱۳۸۵. بررسی اثرات جایگزینی کنجاله کانولا به‌جای آرد ماهی بر رشد، ترکیب لاشه، پارامترهای بیوشیمیایی در قزل‌آلای رنگین‌کمان. رساله مقطع دکترای تخصصی (Ph.D).

٤- علیشاهی، م.، مصباح. م.، نجف‌زاده، ح.، و خواجه، غ. ۱۳۸۸. اثر اکیناسه پورپورآ *Echinacea purpurea* بر پاسخ ایمنی ماهی کپور علفخوار *Ctenopharyngodon idella*، گزارش پایان طرح تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران اهواز، شماره طرح ۳۱۹.

۵- علیشاهی، م.، نجف‌زاده، ح.، قربانپور، م.، و مصباح، م.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضدباکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیه عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در قزل‌آلا. نخستین همایش ملی بیماری‌های اقتصادی قزل‌آلای رنگین‌کمان. کتابچه مقالات کامل، صفحه ٤-۱.

٦- علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، و زرگر، ا، ۱۳۹۱. مقایسه اثر تحریک ایمنی و رشد ارگوسان و لوامیزول با برخی عصاره‌های گیاهی در ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*، مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ٦۹، ۱، صفحه ۲۵-۱۷.

۷- فغانی، ط. ۱۳۸۵. اثر ارگوسان و واکسن گاروتیل بر فاکتورهای رشد، بازماندگی، تحریک سیستم ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۲۳ صفحه.

۸- وهاب‌زاده‌رودسری، ح. ۱۳۸۲. ارزیابی کارایی پراکسید هیدروژن و لوامیزول هیدروکلراید در تیمار تخم‌ها و نوزادان تاس‌ماهی ایرانی و کپور چینی، رساله دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۰۷ صفحه.

9. Alvarez-pellitero, P., Stija-Bobadilla, A., Bermuolez, R., and Quiroga, M.I., 2006. Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus moximus* (1) (Teleostei) Inter. J. Immunopathol. Pharmacol. 19 (4), 727-738.
10. Divyagnaneswari, M.D., Christybapita, A., and Dinakaran, R., 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by Solanum trilobatum leaf fractions. Fish shellfish immunol. 23, 249-259.
11. Ertsvag, H., and Valla, S., 1998. Biosynthesis and applications of alginates. Polym. Degrad. Stabil. 59, 85-91.
12. Gioacchini, G., Smith, P., and Carnevali, O., 2008. Effects of Ergosan on the expression of cytokine genes in the liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to enteric red mouth vaccine .Vet. Immunol. Immunopath. 123, 215-222.
13. Gopalakannan, A., and Arul, V., 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture, 255, 179-187.
14. Heidarieh, M., Afsharnasab, M., Soltani, M., Dashtyannasab, A., Rajabifar, S., and Sheikhzadeh, N., 2010. Effects of Ergosan and Vibromax to prevent Vibriosis and WSSV in *Litopeaneus vannamei*, J. Fish. Aqua. Sci. 5 (2), 120-125.
15. Ispir, U., and Dorueu, M., 2005. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, walbaum*). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29, 1169-1176.
16. Iwama, G., and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish, pp. 73-114.
17. Kajita. Y., Sakai, M., Atsuta, S., and Kobayashi, M., 1990. The immunodulatry effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. fish pathology, 25, 93-98.
18. Kumari, J.A., and Sahoo, P.K.A., 2005. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). Aquaculture Research, 37(5), 500-509.
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, 9-20.
20. Mulero, V., Esteban, M.A., Munoz, J., and Meseguer, J., 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fish & shellfish Immunology. 8, 49-62.
21. Nussler, A.K., and Thompson, A.W., 1992. Immunomodulatory agents in the laboratory and clinic. Parasitology, 105, 5-23.
22. Osserman, E.F., and Lawlor, D.P., 1966. Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. J. Exp. Med. 124, 921-951.
23. Peddie, S., Zou, J., and Secombes, C.J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan, Veterinary Immunology and Immunopathology, 86, 101-113.
24. Raa, J., 1996. The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev. Fish. Sci. 4, 229-288.
25. Røed, K.H., Fjalestad, K.T., and 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. Current research status of fish immunostimulants, Aquaculture, 172, 92-63.
27. Webster, C.D., Tru, L.G., and Tidewell, J.H., 1997. Growth and body composition of channel catfish (*Ictaharus punctatus*) fed diets containing various percentage of canola meal Aquaculture, 150, 103-113.
28. Yuan, C., Li, D., Chen, W., Sun, F., Wu, G., Gon, Y., Tang, J., Shen, M., and Han, X., 2007. Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Springer Science + Business Media, Inc.