اثرات تاثیر ایمنواستیمولنت لیپتوزا، مالاشیت گرین و تتراسایکلین بر میزان فاکتورهای رشد و بقای بچه ماهیان کپور وحشی

محمد رضا قمی[1،*]، مهدی سهراب نژاد[2]، موسی زارعی[3]

۱. استادیار شیلات، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، تنکابن
۲. کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۳. کارشناس شیلات، کارگاه تکثیر و پرورش شهید رجایی ساری، ساری

* **مسئول مکاتبات**. تنکابن، گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، تلفن: ۰۹۱۱۳۵۲۰۶۶۹، فاکس: ۰۱۵۱۳۴۰۸۷۲۱
پست الکترونیکی: mghomi@tonekabon.iau.ac.ir
محل انجام تحقیق: ساری، کارگاه تکثیر و پرورش شهید رجایی ساری

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۳

چکیده

در این پژوهش، به بررسی استفاده جداگانه یا ترکیبی از مواد ایمنواستیمولنت لیپتوزا، مالاشیت گرین و آنتی-بیوتیک تتراسایکلین در رابطه با پارامترهای رشد و بقای گونه کپور وحشی در مراحل رسیدن به وزن مطلوب جهت رهاسازی به دریا پرداخته شد. در این مطالعه که در کارگاه تکثیر و پرورش شهید رجایی ساری انجام شد، از تعداد ۴۰ قطعه بچه ماهی کپور در حدود ۲ گرمی در یک آزمایش فاکتوریل دو فاکتوری به مدت ۳۰ روز استفاده گردید. استفاده دائم (هفته ای یک بار) از سم مالاشیت گرین به همراه آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش (در یک هفته ابتدایی آداپتاسیون و ۳۰ روز آزمایش)، منجر به افزایش معنی‌دار (P <۰/۰۵) بقای بچه ماهیان کپور وحشی گردید. استفاده از ایمنواستیمولنت لیپتوزا، میزان تلفات ماهیان را به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) در تیمارهای ۰/۱، ۰/۳، و ۰/۵ درصد نسبت به شاهد (صفر درصد) کاهش داد. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده تنها از ایمنواستیمولنت لیپتوزا در جهت جایگزین شدن با سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین، جهت پرهیز از آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات ناشی از مصرف سم مالاشیت گرین می‌تواند قابل توصیه باشد.

واژه‌های کلیدی: ایمنواستیمولنت لیپتوزا، مالاشیت گرین، آنتی بیوتیک تتراسایکلین، رشد و بقا، کپور وحشی

مقدمه

استفاده از مواد ایمنواستیمولنت (محرک ایمنی) بعنوان مکمل‌های تغذیه‌ای در افزایش دفاع و مقاومت ماهی در مقابل عوامل بیماری‌زا و زمان‌های مواجهه با استرس زیاد، همچون رقم‌بندی، تکثیر، انتقال از دریا و واکسیناسیون، اهمیت بسیاری دارد (۱). ایمنواستیمولنت‌ها بر اساس منشا به چندین گروه، شامل مواد استخراج یافته جلبکی، باکتریایی، حیوانی، فاکتورهای تغذیه‌ای، هورمون‌ها و سیتوکین-ها تقسیم‌بندی می‌شوند (۲).

مواد ایمنواستیمولنتی دارای نام‌های تجاری مختلف بر اساس شرکت سازنده خود هستند که معروف‌ترین آن‌ها EcoActiva، MacroGard، AquaSol، MacroGard Adjuvant، و Liptosa است. مواد ایمنواستیمولنتی با منشا موادی چون گلوکان (Glucan) در ماهیان آتلانتیک سالمون (*Salmo salar*) (۳)، *Acipenser ruthenus* × *A. baerii* (۴)، *Oncorhynchus kisutch* (۵)، *Sparus aurata* (۶)،

Dicentrarchus labrax (۷)، لـــــوامیزول (Levamisole) در ماهیـــان آتلانتیـــک ســـالمون (*Salmo salar*) (۸)، *Paralychthis olivaceous* (۹)، *Sparus aurata* (۱۰)، کیتین (Chitin) در ماهیـــــــــــان *Seriola quinqueriadiata* (۱۱)، *Sparus aurata* (۱۲)، آلژینـــــــات (Alginate) در مـــــــاهی *Hippoglossus hippoglossus* (۱۳) مـــورد استفاده واقع شده است.

از طـرف دیگـر، اسـتفاده از مالاشـیت گـرین بـه عنوان داروی گندزدای موثر بر علیه تعـداد زیـادی از عوامل انگلی داخلی و خارجی ماهیان، از سال ۱۹۵۰ مطرح شده است (۱۴). اهمیت مالاشیت گرین زمانی بـه اوج خـود رسـید کـه کنتـرل کننـده قـارچهـای ساپرولگنیا (۱۵ و ۱۶) و همینطور عفونتهـای کلیـه ماهیان قزل آلا (۱۷) تشخیص داده شد. حمام کوتـاه مدت مالاشیت گرین همچنین برای کنتـرل بیمـاری فلاووباکتریوم آبشش آزاد ماهیـان مـوثر اسـت (۱۸). استفاده از این دارو در بسیاری از کـشورها محـدود و در مواردی، ممنوع شده است (۱۹).

تتراسایکلین یکی از رایجترین آنتی بیوتیکهـای مورد استفاده در پرورش آبزیان است که بر محـدوده وسیعی از عوامل بیماری زا با داشـتن قیمـت پـائین، موثر است (۲۰). اثرات زیانبار رهاسازی مـواد آنتـی-بیوتیکی بر محیط زیست و باکتریهـای محیطـی، از عوامل محدود کننده اسـتفاده از ایـن مـاده هـستند. ساموالـسون و همکـاران (۲۱) گـزارش کردنـد کـه باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک، قادر به زیست در رسوبات مزارع ماهی به مدت حداقل ۱۸ ماه از زمـان استفاده هستند. در برخی گزارشها به افزایش تلفات ماهیان در زمان استفاده از تتراسایکلین اشـاره شـده است (۲۲)، امـا دوزهـای پـائینتـر آن، اثـرات مـضر کمتری دارد (۲۳).

ماهی کپور وحشی از جمله ماهیان بومی دریـای خزر و از جمله ماهیان مهم اقتصادی مـورد صـید در این دریا به شـمار مـیرود. میـزان صـید ایـن مـاهی استخوانی در سال ۱۳۸۵ به میـزان ۱۷۶۰ تـن بـوده است (۲) که بعد از ماهیان سفید و کفال قرار داشـته است. سالانه صدها هزار بچه ماهی کپور وحـشی ۰/۵ تا ۲ گرمی توسط سازمان شیلات کـشور بـه منظـور افزایش ذخایر دریا، رهاسازی میشوند. به علت نبـود اطلاعات در زمینه استفاده جداگانه یا ترکیبی از مواد ایمنواستیمولنت، سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک تتراسـایکلین بـرای افـزایش بقـای کپورماهیـان و خصوصا در گونه کپور وحشی در مراحل رسـیدن بـه وزن مطلوب جهت رهاسازی به دریا، این تحقیق برای اولین بار به بررسی پارامترهای رشد و بقا در رابطه بـا استفاده از مواد مذکور در ایـن گونـه ارزشـمند مـی-پردازد.

مواد و روشها

ماهی و تیمارهای آزمایش

این تحقیق در تابستان سـال ۱۳۸۸ و در کارگـاه تکثیر و پـرورش رجـایی سـاری انجـام شـد. در ایـن مطالعه، تعداد ۴۰ قطعه بچه ماهی کپور در حدود ۲ گرمی برای هر تکرار آزمـایش انتخـاب شـد. ماهیـان مورد استفاده، ابتدا به مدت یک هفته با شـرایط ایـن آزمایش سازش یافتند. در این تحقیق، از یک آزمـون فاکتوریل دو فاکتوری استفاده شد. فاکتور اول، شامل ۴ حالت اسـتفاده و عـدم اسـتفاده از سـم مالاشـیت گرین و آنتیبیوتیک اکسی تتراسایکلین (بـه صـورت: ۱- عدم استفاده در کـل دوره آزمـایش، ۲- اسـتفاده اولیه در مدت یک هفته آداپتاسیون و سپس قطع آن با شروع آزمایش، ۳- استفاده بعد از دوره آداپتاسیون تا انتهای آزمایش و ۴- استفاده در کل دوره آزمایش) و فـاکتور دوم، شـامل ۴ غلظـت از ایمنواسـتیمولنت (Liptosa ®) (بـــا مقـــادیر ۰، ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۵ درصد) در یک آزمایش فاکتوریل ۲ فاکتوره آزمـایش گردید. سایر شرایط مطلوب پرورش، از جملـه ورود و خروج آب، شستشوی تشتکها (هر ۳ روز یک بـار)، مراقبتهای بهداشتی ماهیان، شمارش تلفات در طی مدت زمان آزمایش (۳۰ روز) به طور یکسان بـر روی همه تیمارها اعمال گردید. بر اسـاس ۱۶=۴×۴ تیمـار این تحقیق، تعداد ۳۲ =۲×۱۶ واحد آزمایش (مخـازن پلاستیکی ۵۰ لیتری) با ۲ تکرار مـورد اسـتفاده واقـع شد که کلاً ۱۲۸۰ =۴۰×۳۲ قطعه بچه ماهی کپور را در بر گرفـت و مخـازن پلاسـتیکی بـا آب ورودی در حدود ۲ لیتر در دقیقه پذیرای بچـه ماهیـان بودنـد.

غلظت مالاشیت گرین مورد استفاده در حمام کوتاه مدت (۲ ساعت) ماهیان به طور هفته‌ای یک بار به میزان ppm ۰/۱ و غلظت تتراسایکلین خوراکی، به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم زی‌توده زنده ماهی به ازای غذای توزیع شده روزانه بوده است. ایمنواستیمولنت لیپتوزا و تتراسایکلین در غلظت‌های مورد استفاده در تیمار مورد نظر با غذا، ترکیب و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. غذادهی بر اساس ۱۰ درصد وزن بدن در طی ۴ بار در روز به طور یکسان برای کلیه تیمارها انجام شد. تیمارهای مورد آزمایش از غذای کنسانتره آغازین کپور شرکت اصفهان مکمل با حداقل ۳۲ درصد پروتئین، ۱۰ درصد چربی، ۱۵ درصد خاکستر و ۵ درصد فیبر به شکل خمیری تغذیه شدند.

ایمنواستیمولنت مورد استفاده در این تحقیق، از شرکت لیپتوزا (Liptosa, Madrid, Spain) با فرمول دارای حق انحصاری (Patent) بوده است. اکسی تتراسایکلین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت داملران (بروجرد، ایران) و مالاشیت گرین از شرکت مرک (آلمان) بود.

اندازه‌گیری فاکتورهای رشد و فاکتورهای کیفی آب

اندازه‌گیری SGR و FCR با استفاده از فرمول-های زیر انجام شده است:

افزایش وزن بدن / مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی= ضریب تبدیل غذایی (FCR)

۱۰۰× (تعداد روزهای پرورش / [Ln وزن اولیه - Ln وزن نهایی]) = ضریب رشد ویژه (SGR)

فاکتورهای اکسیژن محلول (با استفاده از دستگاه اکسیژن متر دیجیتال WalkLab از شرکت Trans Instrument با دقت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، pH و دما (دستگاه pH متر مدل 55 pH از شرکت Milwaukee با دقت ۰/۱ واحد) به طور روزانه و فاکتورهای نیتریت، نیترات، آمونیوم و فسفات (تست کیت‌های Visocolor ECO شرکت Machery-Nagel) به طور هفتگی کنترل شدند. میزان pH در محدوده ۸ تا ۸/۴، اکسیژن محلول همیشه فراتر از ppm ۶/۵ و دما در محدوده ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی-گراد قرار داشت. فواصل زیست‌سنجی به صورت روز نخست آزمایش و روز ۳۰ (روز پایان آزمایش) بود. محاسبه وزن ماهیان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم محاسبه گردید.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از این تحقیق (متغیر وابسته) که شامل وزن نهایی، SGR، FCR و میزان بقا بود، با استفاده از روش تحلیل واریانس دو طرفه (فاکتوریل) (General Linear Models= GLM) و انجام آزمون Post hoc دانکن در $P < ۰/۰۵$ مورد تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین از نرم افزار SPSS 16 جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج اثرات اصلی سطوح مختلف (۴ سطح برای هر فاکتور) دو فاکتور در میزان فاکتورهای رشد و بقای ماهیان مورد مطالعه در جدول های ۱ و ۲ و نتایج اثرات متقابل ۱۶ تیمار مورد مطالعه، در قالب جدول ۳ ارائه شده است. بر اساس مفاد جداول ۱ و ۲، تنها میزان تلفات در فاکتورهای اول و دوم، بین ۴ تیمار مورد آزمایش، دارای اختلاف معنی‌دار است ($P <۰/۰۵$) و سایر فاکتورهای رشد، دارای اختلاف غیر معنی‌دار هستند. میزان وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و تلفات در بررسی اثر ترکیبی فاکتورهای اول و دوم بر کپور ماهیان مورد مطالعه در تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بوده است ($P <۰/۰۵$) (جدول ۳).

بحث

مطابق داده‌های جدول ۱، استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش (A4)، منجر به بالاترین میزان ضریب رشد ویژه، کمترین ضریب تبدیل غذایی و کمترین میزان تلفات در بین کلیه تیمارها شده است که تنها در مورد میزان تلفات، اختلافات از لحاظ آماری، معنی-دار است ($P <۰/۰۵$). بنابراین، استفاده دائم (هفته ای یک بار) از سم مالاشیت گرین به همراه آنتی

بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش (۱ هفته ابتدایی آداپتاسیون و ۳۰ روز آزمایش)، منجر به افزایش معنی‌دار بقای بچه ماهیان کپور وحشی می‌گردد. استفاده اولیه از سم مالاشیت گرین و آنتی-بیوتیک اکسی تتراسایکلین در مدت یک هفته آداپتاسیون و سپس قطع آن با شروع آزمایش (تیمار A2)، و استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین بعد از دوره آداپتاسیون تا انتهای آزمایش (A3) اختلاف معنی‌داری را در میزان تلفات نشان ندادند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر اصلی فاکتور اول (استفاده یا عدم استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین) برروی خصوصیات رشد و تلفات ماهیان مورد آزمایش.

اثرات اصلی فاکتور اول*	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	ضریب رشد ویژه (SGR) (٪)	ضریب تبدیل غذایی (FCR)	تلفات (٪)
A1	۱/۸۰ ± ۰/۱۱	۲/۳۸ ± ۰/۵۰	۰/۹۱ ± ۰/۳۱	۲/۹۵ ± ۱/۷۲	۷/۸۷ ± ۳/۶۸ a**
A2	۱/۹۷ ± ۰/۱۴	۲/۷۸ ± ۰/۵۶	۱/۱۷ ± ۰/۶۹	۲/۶۷ ± ۱/۸۲	۷/۱۲ ± ۱/۷۲ ab
A3	۱/۹۴ ± ۰/۱۵	۲/۷۵ ± ۰/۶۱	۱/۱۷ ± ۰/۵۷	۲/۶۰ ± ۱/۹۲	۶/۳۷ ± ۲/۱۳ ab
A4	۱/۹۶ ± ۰/۱۷	۲/۸۹ ± ۰/۶۹	۱/۳۱ ± ۰/۵۷	۱/۹۴ ± ۰/۹۴	۵/۲۵ ± ۲/۸۱ b

میانگین هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون هستند با هم اختلاف معنی دار ندارند ($P > ۰/۰۵$). **A1 (عدم استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی-بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش)؛ **A2** (استفاده اولیه از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در مدت یک هفته آداپتاسیون و سپس قطع آن با شروع آزمایش)؛ **A3** (استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین بعد از دوره آداپتاسیون تا انتهای آزمایش) و **A4** (استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش).

جدول ۲- اثر اصلی فاکتور دوم (غلظت های مختلف ایمنواستیمولنت لیپتوزا) برروی خصوصیات رشد و تلفات ماهیان مورد آزمایش.

اثرات اصلی فاکتور دوم*	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	ضریب رشد ویژه (SGR) (٪)	ضریب تبدیل غذایی (FCR)	تلفات (٪)
B1	۱/۸۷ ± ۰/۱۰	۲/۶۹ ± ۰/۶۲	۱/۳۲ ± ۰/۵۶	۲/۱۶ ± ۱/۵۱	۹/۶۲ ± ۲/۸۷ a**
B2	۲/۰۲ ± ۰/۱۷	۲/۷۷ ± ۰/۶۴	۱/۰۵ ± ۰/۵۶	۲/۷۵ ± ۱/۷۸	۶/۱۲ ± ۲/۳۵ b
B3	۱/۸۶ ± ۰/۰۷	۲/۷۲ ± ۰/۵۱	۱/۱۳ ± ۰/۶۱	۲/۵۴ ± ۱/۸۵	۵/۵۰ ± ۱/۴۱ b
B4	۱/۹۱ ± ۰/۲۰	۲/۶۳ ± ۰/۶۷	۱/۰۷ ± ۰/۵۳	۲/۷۱ ± ۱/۵۳	۵/۳۷ ± ۱/۹۲ b

* غلظتهای ایمنواستیمولنت لیپتوزا: B1 (صفر درصد)؛ B2 (۰/۱ درصد)؛ B3 (۰/۳ درصد) و B4 (۰/۵ درصد).

**میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون هستند با هم اختلاف معنی‌دار ندارند ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۳- اثر متقابل فاکتورهای اول و دوم برروی خصوصیات رشد و تلفات ماهیان مورد آزمایش.

اثرات متقابل فاکتورهای اول و دوم *		وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	ضریب رشد ویژه (SGR) (٪)	ضریب تبدیل غذایی (FCR)	تلفات (٪)
A1*B1	(۱)**	۱/۷۸ ± ۰/۰۴	۲/۱۶ ± ۰/۱۸ b	۱/۱۰ ± ۰/۰۹	۲/۲۸ ± ۰/۴۳ b	۱۳/۰۰ ± ۴/۲۴ a***
A1*B2	(۲)	۱/۹۲ ± ۰/۲۱	۲/۴۷ ± ۰/۷۴ ab	۰/۸۸ ± ۰/۵۱	۳/۷۵ ± ۳/۱۸ a	۷/۰۰ ± ۱/۴۱ b
A1*B3	(۳)	۱/۷۷ ± ۰/۰۳	۲/۷۵ ± ۰/۸۲ ab	۰/۸۴ ± ۰/۲۵	۲/۳۳ ± ۲/۰۵ b	۵/۵۰ ± ۰/۷۰ b
A1*B4	(۴)	۱/۷۲ ± ۰/۰۷	۲/۱۷ ± ۰/۱۴ b	۰/۸۲ ± ۰/۳۸	۳/۴۵ ± ۱/۷۰ a	۶/۰۰ ± ۱/۴۱ b
A2*B1	(۵)	۱/۹۴ ± ۰/۰۳	۳/۳۸ ± ۰/۶۲ ab	۱/۹۴ ± ۰/۶۰	۱/۰۶ ± ۰/۴۳ c	۸/۵۰ ± ۲/۱۲ ab
A2*B2	(۶)	۲/۰۶ ± ۰/۲۹	۲/۵۲ ± ۰/۵۳ ab	۰/۷۰ ± ۰/۲۴	۳/۴۱ ± ۱/۶۸ a	۷/۰۰ ± ۲/۸۲ b
A2*B3	(۷)	۱/۸۶ ± ۰/۰۵	۲/۵۲ ± ۰/۴۵ ab	۱/۰۶ ± ۰/۷۶	۳/۰۰ ± ۲/۳۴ a	۶/۰۰ ± ۰/۰۰ b
A2*B4	(۸)	۲/۰۱ ± ۰/۰۲	۲/۷۱ ± ۰/۶۰ ab	۱/۰۱ ± ۰/۷۹	۳/۲۱ ± ۲/۷۷ a	۷/۰۰ ± ۱/۴۱ b
A3*B1	(۹)	۱/۸۰ ± ۰/۰۷	۲/۴۶ ± ۰/۶۵ ab	۱/۰۴ ± ۰/۸۱	۳/۴۵ ± ۳/۰۴ a	۹/۵۰ ± ۰/۷۰ ab
A3*B2	(۱۰)	۲/۱۴ ± ۰/۰۳	۳/۶۰ ± ۰/۳۸ a	۱/۸۳ ± ۰/۳۱	۰/۹۸ ± ۰/۲۳ c	۵/۵۰ ± ۲/۱۲ b
A3*B3	(۱۱)	۱/۹۶ ± ۰/۰۱	۲/۴۹ ± ۰/۴۱ ab	۰/۸۳ ± ۰/۴۶	۳/۶۶ ± ۲/۷۴ a	۶/۵۰ ± ۰/۱۱ b
A3*B4	(۱۲)	۱/۸۷ ± ۰/۱۷	۲/۴۸ ± ۰/۰۶ ab	۱/۰۰ ± ۰/۲۴	۲/۳۳ ± ۰/۴۳ b	۵/۰۰ ± ۲/۸۲ b
A4*B1	(۱۳)	۱/۹۷ ± ۰/۱۴	۲/۷۸ ± ۰/۴۵ ab	۱/۲۱ ± ۰/۳۳	۱/۸۶ ± ۰/۷۱ b	۸/۵۰ ± ۲/۱۲ ab
A4*B2	(۱۴)	۱/۹۸ ± ۰/۱۶	۲/۴۸ ± ۰/۲۵ ab	۰/۷۸ ± ۰/۰۷	۲/۸۷ ± ۰/۵۳ a	۵/۰۰ ± ۴/۲۴ b

A4*B3 (۱۵)	۱/۸۶ ± ۰/۰۱	۳/۱۰ ± ۰/۵۲ ab	۱/۸۲ ± ۰/۵۷	۱/۱۹ ± ۰/۴۸ c	۴/۰۰ ± ۱/۴۱ b
A4*B4 (۱۶)	۲/۰۵ ± ۰/۳۵	۳/۱۹ ± ۱/۲۸ ab	۱/۴۵ ± ۰/۸۶	۱/۸۴ ± ۱/۵۱ b	۳/۵۰ ± ۰/۷۰ b

* ترکیب فاکتورهای اول و دوم: فاکتور اول شامل:A1 (عدم استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش)؛ A2 (استفاده اولیه از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در مدت یک هفته آداپتاسیون و سپس قطع آن با شروع آزمایش)؛ A3 (استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین بعد از دوره آداپتاسیون تا انتهای آزمایش)؛ A4 (استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش)؛ فاکتور دوم شامل: غلظتهای ایمنواستیمولنت لیپتوزا: B1 (صفر درصد)؛ B2 (۰/۱ درصد)؛ B3 (۰/۳ درصد) و B4 (۰/۵ درصد).

** شماره تیمارها در پرانتز نوشته شده است.

***میانگین هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون هستند با هم اختلاف معنی دار ندارند ($P > ۰/۰۵$).

غلظت‌های معمول مورد کاربرد از مالاشیت گرین در برخی از ماهیان به میزان ppm ۰/۱۵ تا ۰/۲ است (۱۵). هر چند غلظت مالاشیت گرین مورد استفاده در این تحقیق به طور هفتگی به میزان ppm ۰/۱ بوده است، اسوبودوا و همکاران (۲۴) تغییرات فاحشی را در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و پروتئین کل پلاسمای خون کپور با غلظت ppm۰/۵ در طی ۶ روز استفاده بیان داشتند. همچنین، حسنابادی زاده و همکاران (۱)، در تحقیقی از میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم تتراسایکلین برای جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی ماهی کپور معمولی استفاده کردند و دریافتند که میزان گلبول‌های سفید در مقایسه با شاهد کاهش یافته است.

استفاده از غلظت‌های مختلف ایمنواستیمولنت لیپتوزا روی میزان ضرایب رشد ویژه و تبدیل غذایی ماهیان مورد آزمایش، به لحاظ آماری، تفاوت معنی-داری نشان نمی‌دهد و تنها میزان تلفات ماهیان را به طور معنی‌داری در تیمارهای ۰/۱، ۰/۳، و ۰/۵ درصد نسبت به شاهد (صفر درصد) کاهش داده است (جدول ۲). بنابراین، به کارگیری ایمنواستیمولنت لیپتوزا در افزایش بقای بچه ماهیان کپور وحشی موثر است. بریکنل و دالمو (۳) استفاده از مواد ایمنو استیمولنت را در به مدت ۴ تا ۶ هفته به منظور افزایش ایمنی ماهیان، خصوصا در مواقع خطرات بیماری همچون تغییرات دمایی در پائیز و بهار، قبل از فصل تکثیر و مرحله قبل از حرکت به دریا مفید می‌دانند. لین و ژانگ (۲۴ و ۲۵) گزارش کردند که غلظت ۰/۵ تا ۱ درصد از گیاه ایمنواستیمولنت *Ganoderma lucidium* در افزایش ایمنی حیوانات موثر است. دوگنسی و همکاران (۲۶) در پژوهشی نشان دادند که غلظت ۰/۱ درصد از دو گیاه ایمنواستیمولنت گزنه (*Urtica dioica*) و داروش (*Viscum album*) موجب افزایش میزان ضریب رشد ویژه ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید و استفاده از ۱ درصد از گیاه ایمنواستیمولنت زنجبیل (*Zingiber officinale*) موجب افزایش معنی‌دار فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های لکوسیتی خون ماهی قزل آلا شد.

در تحقیقات چانگ و همکاران (۲۷) از ترکیبات ایمنواستیمولنت گلوکان در مقادیر ۰/۲، ۱ و ۲ درصد مورد استفاده در غذای میگو به این نتیجه رسیدند که استفاده از غلظت ۰/۲ درصد این مواد، در کنترل بیماری WSSV در میگوها غیر موثر است. کاسترو و همکاران (۲۸) اثر دو ایمنواستیمولنت بتا گلوکان (Beta glucan) و مانیوریک اسید (Mannuronic acid) را بر میزان فاکتورهای رشد و بقای ماهی *Solea senegalensis* تا ۱۲۰ روز بعد از تخم گشایی، مطالعه کردند و گزارش نمودند که اختلاف معنی‌داری بین فاکتورهای رشد و میزان تلفات در دو ماده ایمنواستیمولنت و تیمار شاهد وجود نداشت. غلظت ۰/۲ درصد ایمنو استیمولنت EcoActiva در ماهی *Pagrus auratus* به طور معنی‌داری موجب افزایش ضریب رشد ویژه نسبت به تیمار شاهد در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد شده است (۲۹) و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، اختلافی با شاهد را نشان نداد. فلیکس و همکاران (۳۰) در یک مطالعه روی میگوی ببری دریافتند که استفاده از غلظت ۱ درصدی از ایمنواستیمولنت گیاه دریایی *Sargassum wigthii*، بالاترین میزان بقا (۸۴ درصد) را در بین تیمارهای آزمایش نشان داده است.

در بررسی اثر ترکیبی استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با ایمنواستیمولنت لیپتوزا، تیمار دهم (A3B2)

(استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین بعد از دوره یک هفته‌ای آداپتاسیون تا انتهای آزمایش و غلظت ۰/۱ درصد از ایمنواستیمولنت لیپتوزا) بالاترین نرخ وزن نهایی (۳/۶ گرم) و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی (۰/۹۸) را نشان داد و تفاوتش با سایر تیمارها معنی-دار بوده است (P <۰/۰۵) (جدول ۳). همچنین کمترین میزان تلفات در تیمار ۱۶ (A4B4) (استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش و غلظت ۰/۵ درصد از ایمنواستیمولنت لیپتوزا) حاصل شد که با سایر تیمارهای دریافت کننده ایمنواستیمولنت لیپتوزا در مقادیر ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۵ درصد (تیمارهای ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴ و ۱۵) تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد (P > ۰/۰۵) (جدول ۳). بنابراین کاربرد هر کدام از مقادیر ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ درصد از ایمنواستیمولنت لیپتوزا در حالت‌های استفاده یا عدم استفاده از تیمار مالاشیت گرین و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین (در ۴ حالت مورد آزمایش در این تحقیق: A1, A2, A3, A4)، منجر به افزایش ایمنی و بقای ماهیان کپور وحشی گردیده است. همین طور، عدم استفاده از ایمنواستیمولنت لیپتوزا (صفر درصد) در تیمارهای شماره ۵، ۹ و ۱۳ (جدول ۳) موجب بروز اختلاف معنی‌دار میزان تلفات نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۱، جدول ۳) و سایر تیمارها در ماهیان شده است. در نتیجه، به عنوان ارزیابی کلی می‌توان بیان داشت که استفاده از ایمنواستیمولنت لیپتوزا در مقادیر ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ درصد در غذای بچه ماهیان کپور وحشی، موجب افزایش ایمنی ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زای حاضر در محیط پرورش و کاهش معنی‌دار میزان تلفات ماهیان می‌گردد. از آنجایی که میزان تلفات تیمارهای ۲، ۳ و ۴ (جدول ۳) (عدم استفاده از سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در کل دوره آزمایش)، اختلافات غیر معنی‌داری را با تیمارهای دریافت کننده ایمنواستیمولنت لیپتوزا و دریافت کننده سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین (تیمارهای ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵ و ۱۶) نشان نمی‌دهد، استفاده از ایمنواستیمولنت لیپتوزا به تنهایی در هر کدام از غلظتهای موثر مورد استفاده در این تحقیق، جهت جایگزین شدن با سم مالاشیت گرین و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین جهت پرهیز از آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات ناشی از مصرف سم مالاشیت گرین می‌تواند قابل توصیه باشد.

منابع مورد استفاده

۱- حسنابادی زاده، ز؛ حاجی مرادلو، ع؛ قربانی، ر؛ خوش باور رستمی، ح؛ و سلیمانی، ن. ۱۳۸۷. مطالعه تأثیر تزریق ویتامین های AD3E و A+C، C، A بر روند ترمیم زخم و برخی از پاسخ های خونی در کپور معمولی *Cyprinus carpio*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد پانزدهم، شماره ششم. ۱۵(۶): ۱۱۷-۱۲۴.

۲- گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، ۱۳۸۶. سازمان شیلات ایران، تهران.

3- Bricknell, I., Dalmo, R. A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol 19: 457-472.

4- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92.

5- Dalmo, R. A., Bogwald, J., Ingebrigtsen, K., Seljelid, R., 1996. The immunomodulatory effect of laminaran [(1,3)-d-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior kidney leukocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. J Fish Dis 19: 449–457.

6- Jeney, G., Jeney, Z., 2002. Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defence mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* × *A. baerii*. J Appl Ichthyol 18: 416-419.

7- Nikl, L., Albright, L. J., Evelyn, T. P. T., 1991. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. Dis Aquat Anim 12: 7-12.

8- Mulero, V. M. A., Esteban, J., Munoz, B., Meseguer, J., 1998. Dietary intake of

levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol 8: 49-62.

9- Bagni, M., Archetti, L., Amadori, M., Marino, G., 2000. Effect of long-term administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J Veterin Medicine B, 47: 745-751.

10- Findlay, V. L., Munday, B. L., 2000. Immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture 23: 369-378.

11- Caceres, B. M., Masumoto, T., Galindo-Villegas, J., Hosokawa, H., 2004. Effect of levamisole by feed intake on innate immune responses of juvenile Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). CIVA 1: 625-634.

12- Kawakami, H., Shinohara, N., Sakai, M., 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. Fish Pathol 33: 287–292.

13- Esteban, M. A., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish Shellfish Immunol 11: 303-315.

14- Skjermo, J., Bergh, O., 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using Artemia for delivery, increases resistance against vibriosis. Aquaculture 238: 107-113.

15- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T., 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinarni Medicina 52: 527–539.

16- Alderman, D. J., Polglase, J. L., 1984. A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Trans British Mycol Soc 83: 313–318.

17- Clifton-Hadley, R. S., Alderman, D. J., 1987. The effects of malachite green upon proliferative kidney disease. J Fish Dis 10: 101–107.

18- Citek, J., Svobodova, Z., Tesarcik, J., 1997. General prevention of fish diseases. In: Diseases of Freshwater and Aquarium Fish (in Czech). Informatorium, Prague. pp. 9–49.

19- Bergwerff, A. A., Kuiper, R. W., Scherpenisse, P., 2004. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). Aquaculture 233: 55-63.

20- Ashrafi Neela, F., Nonaka, L., Suzuki, S., 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. J Microbiol 45: 64-68.

21- Samuelsen, O. B., Torsvik, V., Ervik, A., 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. Sci Total Environ 114: 25-36.

22- Kobayashi, S. R., Yuki, T., Furui, T., Kosugiyama, T., 1964. Calcification in fish and shellfish. I. Tetracycline labeling patterns on scale, centrum, and otolith in young goldfish. Bulletin Jap Soc Fish Sci 30: 6–13.

23- Weber, D., Ridgway, G. J., 1967. Marking Pacific salmon with tetracycline antibiotics. J Fish Res Board Canada 24: 849–865.

24- Svobodova, Z., Groch, L., Flajshans, M., Vykusova, B., Machova, J., 1997. The effect of long-term therapeutic bath of malachite green on common carp (*Cyprinus carpio* L). Acta Veterinaria Brno 66: 111–117.

25- Lin, Z. B., Zhang, H. N., 2004. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. Acta Pharmacol Sin 25: 1387–1395.

26- Dügenci, S. K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J Ethnopharmacol 88: 99–106.

27- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Liao, I. C., 2003. Dietary-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of Penaeus monodon challenged with white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol 15: 297-310.

28- Castro Cunha, M., Rodrigues, P., Soares, F., Makridis, F., Skjermo, J., Dinis, M. T., 2003. Development of the immune system and use of immunostimulants in Senegalese sole *(Solea senegalensis)*. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference. Bergen, Norway. pp. 189-192.

29- Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B. F., Hayball, J. D., 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva_ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. Fish Shellfish Immunol 14: 333-345.

30- Felix S., Robins P. H., Rajeev, A., 2004. Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine alga *Sargassum wightii* (Phaeophyceae/Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea/Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) system. Indian J Marine Sci 33: 361-364.