

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

فریال جواهرزاده دزفول<sup>۱\*</sup>، مجتبی علیشاهی<sup>۲</sup>، مژده چله‌مال دزفولی نژاد<sup>۳</sup>، مهران جواهری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

### چکیده

ماهی بنی یکی از ماهیان بومی استان خوزستان است که اخیراً 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  $21/6 \pm 2/26$  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 لایوزیم 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 تأثیر بر ایمنی ماهی بنی را دارند.

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

### مقدمه

ماهی بنی بدنی کشیده و دوکی شکل دارد که از دو طرف پهن گردیده است. دهان در ناحیه قدامی و دارای حفره دهانی نسبتاً بزرگی می‌باشد (۱).

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

نام علمی این ماهی *Barbus sharpeyi* می‌باشد.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد 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

## مواد و روش کار

تعداد ۳۷۵ عدد بچه ماهی بنی با وزن متوسط  $21/6 \pm 2/26$  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.

۱۵ آکوارיום 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:  $25 \pm 1^\circ C$ ؛ اکسیژن محلول:  $8-10$  ppm؛ PH  $7/9 \pm 0/1$ ؛  $NO_2 < 0/01$  ppm؛  $NH_3 < 0/1$  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، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم ویتامین C در کیلوگرم خوراک فوق تهیه شده و هر تیمار در سه تکرار در نظر گرفته شد. (۴)

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

به منظور تهیه خوراک پایه از آرد ذرت، آرد جو، آرد گندم، سبوس برنج، سبوس گندم، روغن آفتاب گردان، پودر زئولیت، مخلوط ویتامین با نسبت‌های توصیه شده توسط کاظمی، ۱۳۸۸ (۴) استفاده گردید.

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

اصولاً فعالیتی در آبی پروری موفق خواهد بود که یک پرورش دهنده به کلیه بیوتکنیک تکثیر و پرورش آن گونه اشراف کامل داشته باشد. علی‌رغم 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. در چند 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 زخم‌ها، کاهش اثرات استرس و مقاومت در برابر عوامل پاتوژن و بهبود عملکرد تولید مثل می‌باشد (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 ویتامین C جیره بر برخی فاکتورهای ایمنی و خونی ماهی بنی انجام پذیرفت.

گردید. در این روش ابتدا پودر آگارز به میزان ۰/۱٪ 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 لیزود/یکتیکوس (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 ۴ 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 ۲۴ 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 لایوزیم خالص مرعی (سیگما) نیز برای رسم نمودار فعالیت لایوزیم به همین روش استفاده شده و در انتها میزان فعالیت لیز سلولی سرم‌های مورد آزمایش با نمودار استاندارد فعالیت لایوزیم مرعی ترسیم شده مقایسه گردید، و میزان فعالیت لایوزیم 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. (۱۶)

ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلولهای باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آنها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱

اجزای خوراک به خوبی پودر گردیدند.

اجزای جیره نهایی شامل: ۹۳/۷ در صد ماده خشک، ۲۵/۰۸ پروتئین، ۱۲/۲ چربی، ۷/۲ خاکستر و ۶/۷۵ فیبر بود برای اطمینان از میزان ویتامین C جیره پایه آن را به آزمایشگاه فرستادیم و با روش HPLC میزان ویتامین C،  $15 \pm 2$  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.

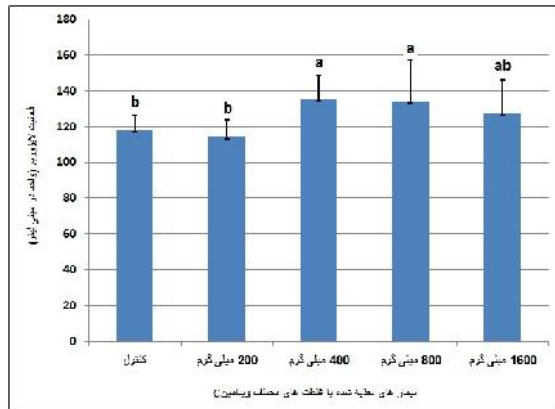
طول دوره پرورش ۶۰ روز بود، میزان غذا را براساس ۳٪ وزن بیوماس داده می شود. در دو نوبت صبح و بعدازظهر و دوره نوری به طور طبیعی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) تغذیه صورت می گیرد.

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 ۴ 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 لایوزیم سرم

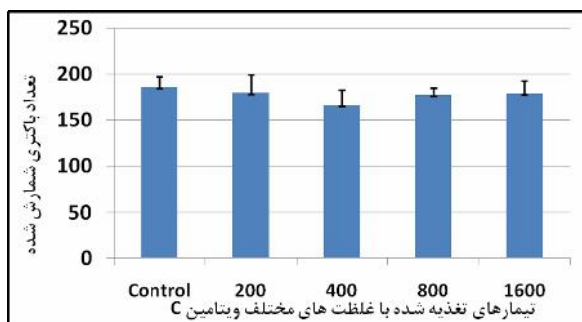
برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت Agarose lysoplate Method توصیه شده توسط Osserman و Lawlor (۱۹۶۶) و Roed و همکاران (۱۹۹۳) با مقداری تغییرات استفاده



نمودار ۱- مقایسه فعالیت لایزوزیم بین تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف ویتامین C (حروف غیر همانم 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 ۴۰۰ 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 ۱۶۰۰ افزایش معنی داری نسبت به کنترل نداشتند ( $P > 0.05$ ) هر چند افزایش فعالیت نسبی در تیمار ۱۶۰۰ 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 ۲ آورده شده است. تعداد باکتری شمارش شده در بین تیمارهای

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 ۲۴ 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

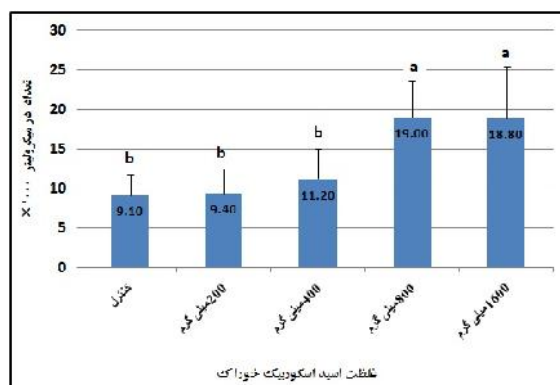
برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده گردید. ابتدا اثر متقابل زمان بر گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Interaction). و با توجه به عدم تاثیر متقابل این دو فاکتور از آنوای یکطرفه برای بررسی تفاوت میانگین تیمارهای مختلف ویتامین C استفاده گردید. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی Duncan در سطح اعتماد ۹۵٪ استفاده شد. (۵)

## نتایج

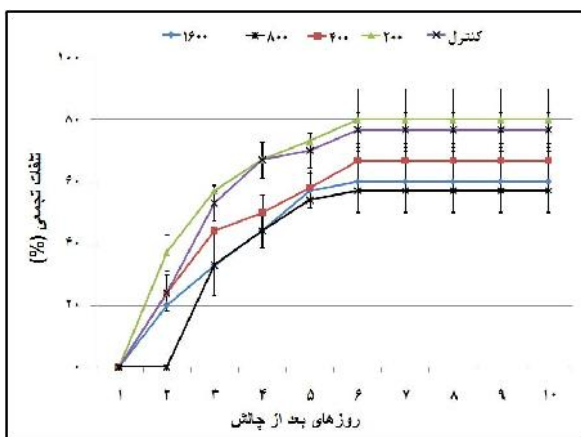
نتایج حاصل از تجویز خوراکی ویتامین C با دوزهای مختلف و تاثیر بر روی فاکتورهای ایمنی:

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

داد ( $P<0.05$ ) در صورتیکه تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ در تلفات بعد از چالش تغییری ایجاد نمودند ( $P>0.05$ ). هر چند در تیمار ۴۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C کاهش نسبی تلفات مشاهده گردید.



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



نمودار ۴- نتیجه چالش باکتریایی تیمارهای مورد بررسی با باکتری ائروموناس 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 معنی داری نشان نداد. ( $P>0.05$ )

#### 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

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

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

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

جدول ۲- نتیجه اندازه گیری نسبت گلبولهای سفید خونی در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلو گرم ویتامین C و گروه شاهد (اطلاعات بر اساس میانگین  $\pm$  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 $\pm$ ۲/۶۶	۶۵/۵ $\pm$ ۴/۴	۱۹/۵ $\pm$ ۷/۱	۱۷/۵ $\pm$ ۷/۶
۲۰۰ میلی گرم در کیلو گرم	۹/۴۰ $\pm$ ۳/۰۴	۶۵/۵ $\pm$ ۷/۱	۱۶/۸ $\pm$ ۶/۴	۱۸/۶ $\pm$ ۷/۳
۴۰۰ میلی گرم در کیلو گرم	۱۱/۲۰ $\pm$ ۳/۸۸ b	۵۷/۵ $\pm$ ۳/۸a	۱۹/۰ $\pm$ ۷/۱ b	۲۲/۶ $\pm$ ۵/۰a
۸۰۰ میلی گرم در کیلو گرم	۱۹/۰۰ $\pm$ ۴/۵۴ b	۵۵/۶ $\pm$ ۸/۶a	۲۳/۱ $\pm$ ۵/۳a	۲۰/۹ $\pm$ ۴/۰a
۱۶۰۰ میلی گرم در کیلو گرم	۱۸/۸۰ $\pm$ ۶/۶۱ b	۵۷/۷ $\pm$ ۱۳/۵a	۲۳/۶ $\pm$ ۸/۷a	۱۵/۴ $\pm$ ۵/۰b

میزان در تیمارهای ۴۰۰ 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 (۲۶، ۹). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک های ایمنی، واکسن ها و برخی پروبیوتیک ها در ماهی گزارش گردیده است (۲۸). همچنین افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کاراس (۷)، ماهی کروکر زرد (۱۵، ۶) و ماهی کپور معمولی (۱۴) بعد از تجویز خوراکی عصاره های 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 استرس ها کمک می نماید.

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

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

تعداد لنفوسیت در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ کاهش معنی دار و تعداد نوتروفیل در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ 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 می شود دارای ارزش اقتصادی می باشد، تلاش در افزایش قدرت ایمنی این ماهی در برابر بیماری های متعدد و رسیدن برای رشد بهتر اهمیت ویژه ای دارد (۱۲). از بین محرک های ایمنی، افزودنی های غذایی یکی از انواع محرک های ایمنی می باشند که ویتامین ها از شاخص ترین افزودنی های غذایی دخیل در پاسخ ایمنی ماهی هستند (۱۳).

غلظت های ۴۰۰، ۸۰۰ افزایش معنی دار فعالیت لایزوزیم را باعث شده اند. تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف در قدرت باکتری کشی سرم مشاهده نشد ولی این قدرت نسبتا در تیمار ۴۰۰ 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

تجویز این ویتامین قرار نگرفته است. نتایج مشابهی از تحقیقات دیگر نیز گزارش گردیده است (۲۶). 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 ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ 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 گلبولهای سفید خونی ترشح می‌شوند، 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 (۱۶، ۱۹، ۲۶، 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 در این تحقیق مشاهده گردید که با وجود افزایش کلی تعداد گلبولهای سفید، در نسبت لکوسیت‌های خونی تغییر معنی‌داری ایجاد نگردید. هر چند ظاهراً تعداد لمفوسیت‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش و نسبت هتروفیل‌ها افزایش نشان می‌دهد. که این یافته‌ها با یافته‌های محققین دیگر در سایر ماهیها مطابقت دارد (۱۷، ۲۷).

همچنین فنواتی (۱۳۸۸) و علیشاهی و همکاران (۱۳۸۳) تجویز محرک‌های ایمنی با منشأ 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 C اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. عدم تغییر قدرت باکتری کشی سرم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی در برخی تحقیقات گزارش گردیده است (۲۴).

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 C و 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 (۱۶، ۱۹). در تحقیق جاری حجم فشرده گلبولی (PCV) و تعداد گلبولهای قرمز و میزان هموگلوبین و نیز اندیس‌های گلبولی MCH، MCV 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 بدن با تجویز خوراکی ویتامین C، فعالیت هماتوپوئیک (خونسازی) و نیز میزان تخریب گلبولی تحت تاثیر

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.

بعنوان نتیجه گیری کلی و بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان 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 بی‌تأثیر بوده و افزایش تعداد گلبولهای سفید خونی را باعث شده است و بهترین دوز پیشنهادی میزان ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشد.

## 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 ۸۲۵۸۴۸۱، صفحه ۱۳.
- ۲- علیشاهی، م. (۱۳۸۳): نقش محرک‌های ایمنی در آبی‌پروری، مجله سازمان نظام دامپزشکی کشور، سال چهارم، شماره سوم: ص ۳۸-۳۳.
- ۳- قنواتی، م. (۱۳۸۸): اثر عصاره داروаш *Viscum album* و سیاه‌دانه *Nigella sativa* بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و کارایی واکسن آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات اهواز.
- ۴- کاظمی، ف. (۱۳۸۸): تأثیر نسبت‌های مختلف کربوهیدرات به چربی جیره در شاخص‌های رشد، تغذیه و ترکیبات لاشه در ماهی بنی جوان پایان‌نامه کارشناسی ارشد شماره ۶: ۶۰۱-۸۸.
- ۵- نظیفی، س. (۱۳۷۶): هماتولوژی و بیوشیمی بالینی پرندگان، (گردآوری و تدوین) چاپ اول،



- 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 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) *Aquaculture*, 218: pp. 1-9.
- 16- Kajita, Y., M. Sakai S., Atsuta, M., (1990): The immunomodulatory 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-gulonolactone 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): Current 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.