دوره سیزدهم ـ شماره ۱ ـ بهار ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.31555.1570

تأثیر مصرف خوراکی عصاره‌ی الکلی جلبک سارگاسوم، *Sargassum angustifolium*، بر برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی ماکرو (*Labidochromis caeruleus*)

زهرا طولابی‌دزفولی[۱*]، مهرزاد مصباح[۲]، رحیم پیغان[۳]، تکاور محمدیان[۴] و سراج بیتا[۵]

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۴

چکیده

استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی و جلبکی حاوی کاروتنوئیدها، یکی از کاربردی‌ترین روش‌های تقویت ایمنی و پیش‌گیری از بیماری‌ها در ماهیان می‌باشد. محرک‌های ایمنی با ارتقای سیستم ایمنی ذاتی می‌توانند از وقوع بیماری‌های عفونی جلوگیری کنند و رژیم غذایی حاوی کاروتنوئیدها، عملکرد سیستم ایمنی در بسیاری از حیوانات آزمایشگاهی را بهبود بخشیده است. به منظور بررسی تأثیر عصاره‌ی الکلی جلبک سارگاسوم، ۱۲۰ قطعه ماهی به طور تصادفی به چهار گروه (۴ تیمار) تقسیم شده (هر آکواریوم حاوی ۳۰ قطعه ماهی با وزن ۰/۶۵±۶/۵ گرم) و به مدت ۶۰ روز برای انجام آزمایش، نگهداری و غذادهی گردیدند. تیمار اول، دوم و سوم به ترتیب با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم عصاره‌ی اتانولی جلبک سارگاسوم به ازاء هر کیلوگرم غذا به مدت دو ماه تغذیه شدند. تیمار چهارم گروه شاهد بود که فقط غذای تجاری (بیومار) دریافت می‌نمود. پس از پایان دوره‌ی ۶۰ روزه‌ی آزمایش، خون‌گیری انجام شد و برخی فاکتورهای خونی و ایمنی بررسی گردید. در بین تیمارهای مختلف، بیش‌ترین میزان PCV، Hb و MCHC در تیمار تغذیه شده با ۵ گرم در کیلوگرم جلبک مشاهده گردید ($p<0/05$). تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با جلبک بیش‌تر از گروه کنترل بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$). فعالیت احیاء NBT سرم در تیمار تغذیه شده با ۱۵ گرم در کیلوگرم عصاره‌ی جلبک سارگاسوم، بیش‌تر از سایر تیمارها و نیز گروه شاهد بود ($p<0/05$). میزان فعالیت کمپلمان در تیمار تغذیه شده با ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم عصاره‌ی الکلی جلبک در روز ۶۰، به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود ($p<0/05$). قدرت باکتری‌کشی سرم تیمارهایی که عصاره‌ی الکلی جلبک را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، تجویز عصاره‌ی الکلی جلبک سارگاسوم به صورت خوراکی باعث تحریک برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی ماکرو می‌گردد.

کلمات کلیدی: عصاره‌ی الکلی، سارگاسوم، فاکتورهای خونی، سیستم ایمنی، ماهی ماکرو، کاروتنوئید

مقدمه

عملکرد کاروتنوئیدها در ماهیان بسیار متنوع و همانند سایر حیوانات بوده و علاوه بر ایجاد رنگ‌های زیبا و مختلف در ماهیان، تأثیر مهمی بر عملکرد سیستم تولیدمثل ماهیان دارند. کاروتنوئیدها پیش‌ساز ویتامین A هستند (White et al. 2003) و آنتی‌اکسیدان‌های قوی (Bell et al. 2000) و ارتقاء بخش سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی محسوب می‌گردند (Amar et al. 2004). کاروتنوئیدها به دو گروه کاروتن‌ها و

[۱*] دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: zahratulaby@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۴] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۵] دانش‌آموخته‌ی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

گزانتوفیل‌ها تقسیم‌بندی می‌گردند. اگرچه بیش از ۶۰۰ نوع کاروتنوئید در طبیعت شناسایی شده است ولی فقط تعداد کمی از آن‌ها در غذای حیوانات، داروسازی و رنگ غذا به کار می‌روند (Bricaud et al. 1998). ماهیان همانند سایر حیوانات قادر به ساخت کاروتنوئیدها نیستند. در شرایط طبیعی موادی شامل جلبک‌ها و سخت‌پوستان منبع غنی از کاروتنوئیدها می‌باشند. با توجه به این که تغذیه نقش بسیار موثری در سلامت و پاسخ ایمنی ماهیان دارد، بنابراین باید به عنوان مکمل غذایی در جیره‌ی غذایی ماهیان استفاده گردند (Wozniake 1996, Lall and Olivier 1993). کاروتنوئیدهای مشتق شده از منابع طبیعی شامل انواع گوناگونی از کاروتنوئیدها از قبیل کاروتن، زیگزانتین، لوتئین، آستاگزانتین و غیره می‌باشند، در صورتی که محصولات سنتزی فقط شامل برخی کاروتنوئیدها مانند کاروتن و آستاگزانتین می‌باشند که فرآوری و تولید آن‌ها گران قیمت بوده و میزان استفاده از آن‌ها در فرمول‌های غذایی آبزیان دارای محدودیت است (Garcia-chavarria and Lara-Flores 2013). جلبک‌های قهوه‌ای علاوه بر این که منبع غنی کاروتنوئیدها هستند، انواع ترکیبات فعال زیستی شامل امگا ۳، پلی‌فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، فوکوسترول و فوکوگزانتین نیز در آن‌ها وجود دارد. محققان نشان داده‌اند که پلی‌فنول‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی بوده و برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان بسیار مؤثرند (Pallela et al. 2010). ماهی ماکرو از ماهیان خانواده‌ی سیکلیده می‌باشد که در گروه سیکلیدهای آفریقایی قرار دارد، غذای طبیعی این ماهی عموماً شامل جلبک‌های دریایی و بی‌مهرگان دریایی است و دمای مناسب برای نگهداری این ماهی حدود ۲۵–۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد (مرادی و لهراسبی ۱۳۸۸). پرورش ماهیان زینتی در چند سال اخیر گسترش یافته و با توجه به وجود ترکیبات محرک ایمنی به ویژه کاروتنوئیدها در جلبک‌های دریایی و این مهم که در رابطه با تأثیر آن‌ها بر فاکتورهای خونی و ایمنی، تحقیقی صورت نگرفته است، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره‌ی الکلی جلبک قهوه‌ای سارگاسوم به عنوان یک افزودنی ایمنی‌زا بر فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی ماهی ماکرو صورت گرفت.

مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماکرو (بدون در نظر گرفتن جنسیت) با میانگین وزن اولیه‌ی ۶/۵±۰/۶۵ گرم و با میانگین سن ۲ ماه از یکی از مراکز پرورش ماهیان زینتی اهواز خریداری شد. برای این کار ۱۲۰ قطعه ماهی به طور اتفاقی به چهار گروه تقسیم شده (هر آکواریوم حاوی ۳۰ قطعه ماهی) و به مدت ۶۰ روز برای انجام آزمایش، نگهداری و غذادهی شدند (تصویر ۱). جیره‌ی غذایی روزانه بر اساس ۲ درصد وزن بدن ماهی‌ها در نظر گرفته شد و سه بار در روز غذادهی انجام می‌شد. تیمار اول، دوم و سوم به ترتیب با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم عصاره‌ی اتانولی جلبک سارگاسوم به ازاء هر کیلوگرم غذا به مدت دو ماه تغذیه شدند. تیمار چهارم، گروه شاهد بود که فقط غذای تجاری (بیومار) که با روغن زیتون پوشش داده شد، دریافت می‌نمود. غذای حاوی عصاره‌ی جلبک نیز مشابه گروه شاهد با روغن زیتون پوشش داده شد (Costa et al. 2013).

تصویر ۱: *Labidochromis caeruleus*

برای تهیه‌ی عصاره، ابتدا جلبک‌های تهیه شده از سواحل بوشهر را چندین مرتبه با آب معمولی شسته

شدند به طوری که هیچ‌گونه شن و مواد خارجی در آن‌ها باقی نماند، در نهایت یک بار با آب مقطر شسته شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه به دور از نور آفتاب روی سفره‌های پلاستیکی قرار داده شده تا کاملاً خشک گردند، سپس توسط مخلوط‌کن برقی آسیاب گردیدند و پودر جلبک‌های تهیه شده تا زمان عصاره‌گیری در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. عصاره‌گیری به روش خیساندن (Macceration) (صمصام‌شریعت ۱۳۷۱)، انجام شد. برای جلوگیری از تخریب کاروتنوئیدها، مرحله‌ی تقطیر (خروج اتانول با حرارت) انجام نگردید و عصاره‌ی اتانولی جلبک سارگاسوم تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و در یخچال نگهداری شد. میزان ماده‌ی خشک عصاره‌ی اتانولی سارگاسوم در یک میلی‌لیتر به طور میانگین ۲۰ میلی‌گرم بود. ابتدا به میزان لازم غذا وزن شد، سپس عصاره‌ی اتانولی جلبک به میزان ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه (به منظور تبخیر شدن اتانول) قرار داده شدند و قبل از بسته‌بندی در ظروف جداگانه، به منظور حفظ و هضم بهتر مواد مؤثره‌ی عصاره‌ی جلبک‌ها و نیز عدم انحلال عصاره در آب، روغن زیتون، روی غذاهای حاوی عصاره و نیز شاهد اسپری گردید، غذای حاوی عصاره برای مدت یک هفته تهیه می‌گردید و بعد از هر بار غذادهی به منظور جلوگیری از اکسیداسیون کاروتنوئیدها، غذا در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده می‌شد. پس از پایان دوره‌ی ۶۰ روزه‌ی آزمایش، خون‌گیری انجام شد، به این منظور از هر تیمار ۱۰ نمونه به طور تصادفی برای خون‌گیری انتخاب شد. پس از بیهوش نمودن ماهی‌ها توسط ماده‌ی بیهوشی MS222 (دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳ دقیقه)، خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های هپارینه شده و نیز غیرهپارینه، از ساقه‌ی دمی انجام شد و خون در دو لوله یکی حاوی هپارین و دیگری بدون هپارین (جهت جدا کردن سرم) ریخته شد.

بررسی کیفی آب: پارامترهایی که در طی دوره به طور مرتب بررسی شدند شامل: اکسیژن: میزان اکسیژن محلول آب و با استفاده از دستگاه اکسیژن‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد و میانگین آن ۶/۲±۰/۷ ppm بود. برای کنترل pH آب هر هفته یک بار از دستگاه pH متر استفاده گردید. میزان آن در طول دوره‌ی پرورش ۷/۳±۲/۲ بود. دما: برای کنترل دمای آب آکواریوم‌ها از دماسنج استفاده و روزانه دما، اندازه‌گیری گردید. میانگین دما در طول دوره ۲۵-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد بود.

برای اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانو مت‌هموگلوبین استفاده شد (Feldman et al. 2000). هماتوکریت (حجم فشرده‌ی گلبولی یا PCV[1]) با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت صورت گرفت (Feldman et al. 2000). اندیس‌های گلبولی شامل، حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردیدند. شمارش کلی گلبول‌های قرمز و سفید ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت، برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق کننده‌ی نات هریک استفاده شد (Thrall 2004).

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰، استفاده گردید. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده برای هر تیمار گزارش گردید.

برای ارزیابی احیاء NBT مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشت و به

1- Packed cell volume

یک لوله‌ی آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید اضافه گردید. پس از سانتریفوژ کردن نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Secombes et al. 1998).

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده شد. قطر هاله‌ی لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری و نتایج به صورت میلی‌متر مربع گزارش گردید (Brata 1993).

انتخاب ماهیان به صورت کاملاً تصادفی[1] انجام پذیرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS-18 صورت گرفت و با این نرم‌افزار میانگین پارامترها مورد مقایسه‌ی آماری قرار گرفت و در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ سنجیده شد. برای مقایسه‌ی پارامترها بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه[2] و پس آزمون توکی[3] استفاده گردید.

نتایج

یافته‌های خون‌شناسی

نتایج مربوط به فاکتورهای خون‌شناسی در تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۲ آورده شده است. در بین تیمارهای مختلف، بیش‌ترین میزان PCV، Hb و MCHC در تیمار تغذیه شده با ۵ گرم در کیلوگرم جلبک مشاهده گردید (p<۰/۰۵). البته افزایش این فاکتورهای خونی در سایر تیمارها نیز مشاهده گردید ولی این افزایش معنی‌دار نبود. تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با جلبک بیش‌تر از گروه کنترل بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). در بین تیمارهای تغذیه شده با جلبک، تیمار ۱۵ گرم در کیلوگرم باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز گردید که نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل بیش‌تر بود، ولی اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با گروه کنترل مشاهده نگردید (p>۰/۰۵).

یافته‌های ایمنی‌شناسی

انفجار تنفسی (احیاء NBT)

نتایج مربوط به فعالیت احیاء NBT سرم در تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۲ آورده شده است. انفجار تنفسی، ۶۰ روز پس از تغذیه با جلبک سارگاسوم، در تیمار تغذیه شده با ۱۵ گرم در کیلوگرم عصاره‌ی جلبک سارگاسوم، بیش‌تر از سایر تیمارها و نیز گروه شاهد بوده است (p<۰/۰۵).

فعالیت کمپلمان

فعالیت کمپلمان در تیمارهای آزمایشی با افزایش میزان عصاره‌ی جلبک در غذا، افزایش یافت. میزان فعالیت کمپلمان در تیمار تغذیه شده با ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم عصاره‌ی الکلی جلبک در روز ۶۰، به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۵) (جدول ۲).

قدرت باکتری‌کشی سرم

جدول ۲ نتایج قدرت باکتری‌کشی سرم در گروه‌های تغذیه شده با جلبک و گروه کنترل را نشان می‌دهد. طبق نتایج به دست آمده قدرت باکتری‌کشی سرم تیمارهایی که عصاره‌ی الکلی جلبک را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵).

1- Completely Randomized Design
2- One Way ANOVA
3- Tukey

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مقادیر فاکتورهای خونی در گروه‌های مختلف ماهیان مورد مطالعه

تیمار جلبک سارگاسوم / پارامتر	۵ (g/kg)	۱۰ (g/kg)	۱۵ (g/kg)	شاهد
PCV (٪)	۲۸/۱۶±۱/۱۶*	۲۷/۵۰±۱/۶۴	۲۷±۲/۰۹	۲۴/۶۶±۲/۲۵
Hb (g/dl)	۶/۱۳±۰/۲۸*	۴/۰۷±۱/۰۹	۵/۲۷±۰/۸۴	۵/۵۹±۰/۴۹
WBC ($\times 10^3$)	۵۰/۶۶±۱۳/۰۶	۴۴/۶۶±۱۵/۲۶	۵۲±۲۰/۷	۳۰/۶۶±۱۱/۵
RBC ($\times 10^6$)	۱/۵۲±۰/۳۳	۱/۳۲±۰/۳	۱/۹۸±۰/۴۷*	۱/۸۴±۰/۳۲
MCV (fl)	۱۹۴/۷۸±۵۴/۳۶*	۲۱۸/۲۵±۵۵/۸۹*	۱۴۲/۲۳±۳۳/۳۰	۱۳۸/۳۳±۳۳/۱۵
MCH (pg)	۳۸/۵۹±۱۵/۵۳	۳۲/۷۵±۱۲/۷۷	۲۸/۵±۱۰/۹۶	۳۰/۸۸±۴/۳۰
MCHC (٪)	۲۱/۸۰±۱/۱۶	۱۴/۸۳±۴/۰۹	۱۹/۶۵±۳/۶۳	۲۲/۸۵±۲/۷

* تغییر معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده شده است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار مقادیر فاکتورهای ایمنی در گروه‌های مختلف ماهیان مورد مطالعه

تیمار جلبک سارگاسوم / فاکتورها	۵ (g/kg)	۱۰ (g/kg)	۱۵ (g/kg)	شاهد
انفجار تنفسی (NBT) (OD 620)	۰/۲۶±۰/۰۱	۰/۲۴±۰/۰۲	۰/۶۶±۰/۱۴*	۰/۲۲±۰/۰۲
کمپلمان (mm^2)	۱۴/۴۹±۱/۹۱	۱۹/۴۱±۲/۵۱*	۲۰/۴۷±۱/۵۷*	۱۴/۱۱±۴/۰۵
قدرت باکتری کشی(CFU/ml)	۵۷/۰۰±۲۲/۱۸	۵۵/۱۶±۲۵/۴۱	۴۳/۸۵±۱۸/۸۸	۶۰/۳۳±۱۲/۲۹
لنفوسیت (٪)	۹۳/۶±۱/۸۱	۹۲/۲۰±۳/۱۱	۸۷/۲۰±۲/۱۶*	۹۶/۶±۳/۴۳
هتروفیل (٪)	۶/۰±۱/۵۸	۷/۷۰±۳/۱۱*	۱۰/۴۰±۲/۸۸*	۲/۴±۲/۶
مونوسیت (٪)	۰/۴±۰/۵۴	۰/۱±۰/۰۱	۲/۴۰±۰/۲۷	۱/۲۰±۰/۱۳

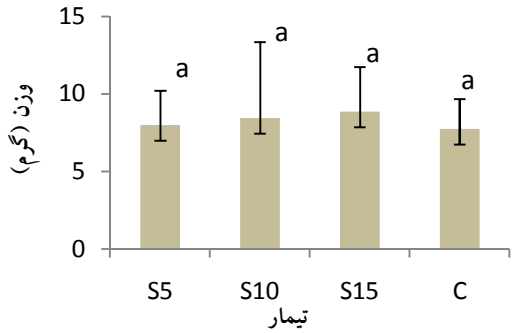
* تغییر معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد مشاهده شده است.

افزایش وزن مطلق (WG)

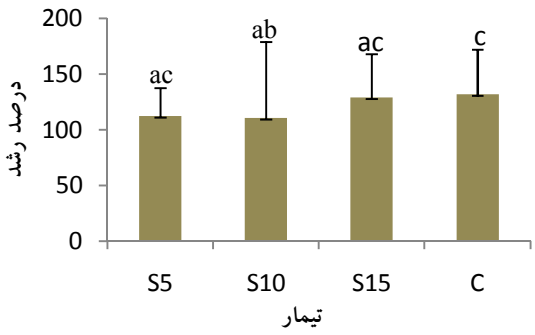
در تمامی گروه‌ها در مقایسه با روز صفر در طی ۶۰ روز افزایش وزن کاملاً بارز بود و وزن گروه‌ها همگی افزایش داشت. اما در مقایسه‌ی بین گروه‌ها، نتایج مربوط به افزایش وزن بدن در طی ۶۰ روز نشان داد که در تیمارهای تغذیه شده با جلبک و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). در مقایسه بین تیمارهای مختلف، بیش‌ترین WG در گروه ۱۵ گرم در کیلوگرم جلبک سارگاسوم (S15) با میزان ۸/۸۶±۲/۸۶ مشاهده گردید (نمودار ۱ و ۲).

افزایش رشد نسبی (RGR)

در روز ۶۰ آزمایش، بیش‌ترین افزایش رشد نسبی در تیمار ۱۵ گرم در کیلوگرم سارگاسوم (S15) مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).



نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار شاخص رشد (افزایش وزن مطلق) بین تیمارهای مورد بررسی از روز ۰ تا ۶۰ نمونه‌گیری (حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد).



نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار شاخص رشد (افزایش رشد نسبی) بین تیمارهای مورد بررسی از روز ۰ تا ۶۰ نمونه‌گیری (حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد).

بحث

به نظر می‌رسد استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی، کاربردی‌ترین روش پیش‌گیری از بیماری‌های ماهیان باشد. محرک‌های ایمنی با ارتقای سیستم ایمنی ذاتی می‌توانند از وقوع بیماری‌های عفونی جلوگیری کنند (Watanuki et al. 2006). علاوه بر کاروتنوئیدها، سایر محرک‌های ایمنی که در آبزی‌پروری مؤثر واقع شده‌اند شامل، کیتین[1] (Esteban et al. 2001)، لاکتوفرین[2] (Sakai et al. 1993)، الیگو دزوکسی نوکلئوتیدها[3] (Tassakka and Sakai 2003) و نایسین[4] (Villamil et al. 2003) می‌باشند. نقش کاروتنوئیدها به ویژه آن‌هایی که منشاء دریایی دارند در سلامت انسان به خوبی اثبات شده‌اند (Sowmya and Schindra 2011). رژیم غذایی حاوی کاروتنوئید، عملکرد سیستم ایمنی در بسیاری از حیوانات آزمایشگاهی را بهبود بخشیده است (Vinkler et al. 2011). کاروتنوئیدها با تحریک فعالیت نوتروفیل‌های خون از طریق افزایش عملکرد میلوپراکسیداز و فاگوسیتوز، باعث القای تکثیر لنفوسیت‌ها، افزایش فعالیت سیتوکروم اکسیداز و پراکسیدهای موجود در ماکروفاژها شده، در نتیجه انفجار تنفسی افزایش می‌یابد. کاروتنوئیدها هر دو نوع عملکرد سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی را افزایش می‌دهند که این موضوع مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد. در زمان وجود آلودگی و عوامل میکروبی، انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در سلول‌های سالم بدن تولید شده که می‌توانند باعث تخریب غشای سلولی شوند. در شرایط طبیعی استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌های داخلی توسط بدن تولید شده که اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (ROS) را حذف می‌کنند اما در شرایط استرس اکسیداتیو شدید، منابع خارجی از آنتی-اکسیدان‌ها مورد نیاز می‌باشد (Chew and Park 2004). نقش‌های مختلف کاروتنوئیدها در آبزیان توسط گزارش-هایی مبنی بر افزایش رشد و بقا تایید شده است (Torrissen 1984). تأثیر کاروتنوئیدهای مصنوعی بر تحریک سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثبات شده است همچنین دیده شده کاروتنوئیدهای با منشأ طبیعی، سیستم ایمنی ذاتی در قزل‌آلای رنگین‌کمان را افزایش داده است (Amar 2000). کاروتنوئیدهای استخراج شده از پوسته‌ی میگو منبع غنی از آستاگزانتین بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی را دارا می‌باشد (Sowmya and Schindra 2012). رژیم غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان از قبیل آلفا توکوفرول باعث افزایش پاسخ سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیان شده است (Ortuno et al. 2000).

Sheikhizadeh در سال ۲۰۱۳ گزارش نمود که منابع طبیعی کاروتنوئید شامل پودر گوجه فرنگی و فلفل شیرین در رژیم غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان رشد و سیستم ایمنی را بهبود می‌بخشد. Elseady و Zahran در سال ۲۰۱۳ بیان نمودند که استفاده از بتاکاروتن در جیره‌ی غذایی می‌تواند به عنوان محرک سیستم ایمنی در تیلاپیای پرورشی، اثرات سرکوب ایمنی ناشی از شرایط استرس‌زا را کاهش دهد. تحقیقات نشان داده است که اضافه کردن کاروتنوئید به غذای ماهیان باعث خوش طعم شدن و

1- Chitin
2- Lactoferrin
3- Oligodeoxynucleotides
4- Nicin

افزایش دریافت غذا گردیده در نتیجه اتلاف غذا کاهش می‌یابد (Mukherjee et al. 2011). توانایی لکوسیت‌ها در کشتن میکروب‌های بیماری‌زا یکی از مهم‌ترین مکانیسم-های حفاظتی محسوب می‌شود (Miyazaki 1998). لکوسیت‌ها نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی داشته و تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر وضعیت سلامت ماهیان در نظر گرفته شود (Flores-Miranda et al. 2011). در تحقیق حاضر تعداد تام گلبول‌های سفید در تمام تیمارهای تغذیه شده با جلبک افزایش یافت ولی این اختلاف معنی‌دار نبود که یافته‌های این تحقیق با نتایج پژوهش Sahoo و Mukherjee در سال ۱۹۹۹ در ماهی کپور هندی (*Labeorohita*) که با جیره‌ی غذایی حاوی کاروتنوئید تغذیه شده بود، مشابهت دارد. تأثیر عصاره‌ی اکالیپتوس در ماهی پنگوسی بررسی شده است و نتایج نشان می‌دهد که افزایش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند به ترکیبات آهن موجود در این ماده نسبت داده شود (Prasad and Priyanka 2011). جلبک‌های دریایی به دلیل توانایی در جذب مواد معدنی از محیط، منبع قابل توجهی از این عناصر می‌باشند. از فراوان‌ترین عناصر معدنی موجود در جلبک‌های دریایی می‌توان پتاسیم، سولفور، آهن و ید را نام برد (Hashim and Chu 2004).

بر اساس نتایج این تحقیق، تجویز خوراکی سارگاسوم سبب افزایش معنی‌دار تعداد گلوبول‌های قرمز در تیمار تغذیه شده با ۱۵ گرم در کیلوگرم جلبک شد. در شمارش تفریقی میزان هتروفیل‌ها در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم عصاره‌ی جلبک به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$)، که این یافته نشان دهنده‌ی افزایش قدرت ایمنی غیراختصاصی می‌باشد.

قدرت باکتری‌کشی سرم نشان دهنده‌ی ایمنی هومورال غیر اختصاصی ماهی می‌باشد و دفاع غیراختصاصی سرم در برابر عفونت‌های باکتریایی را نمایان می‌سازد. در این تحقیق، قدرت باکتری‌کشی سرم تیمارهایی که جلبک، دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان نداد. برخی گزارش‌ها حاکی از عدم تأثیر افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی است، مثل Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و Divyagnaneswari و همکاران (۲۰۰۷) که به ترتیب در ماهی تیلاپیا و قزل‌آلا، عدم تأثیر عصاره گیاه *Solanum trilobatum* در قدرت ضد باکتریایی سرم را گزارش نمودند. یکی از فاکتورهای مرتبط با ایمنی که در مطالعه‌ی حاضر مورد بررسی قرار گرفت، میزان کمپلمان سرم بود که یکی از اجزاء ایمنی غیراختصاصی می‌باشد. مسیر فرعی کمپلمان (راه میان‌بر) که مستقل از آنتی‌بادی می‌باشد در ماهیان نسبت به پستانداران فعال‌تر است. پروتئین‌های این سیستم نقش چندگانه‌ای (اپسونیزاسیون، کشتن باکتری‌ها، کموتاکسی و غیره) را در دفاع بر ضد میکروارگانیسم‌ها به عهده دارند (Balcazar et al. 2008). Amar و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که استفاده از بتاکاروتن به عنوان مکمل غذایی، فعالیت سیستم کمپلمان را در قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌دهد. در تحقیق حاضر نیز، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت کمپلمان در تیمارهای تغذیه شده با عصاره‌ی الکلی جلبک به میزان ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم، نسبت به تیمار شاهد، مشاهده شد. بررسی NBT یک آزمایش سریع و کم هزینه بوده که توانایی فاگوسیت‌ها را به شکل کاهش رنگ ایجاد شده هنگام تولید رادیکال‌های اکسیژن نشان می‌دهد. نوتروفیل‌ها اولین نوع از سلول‌های ایمنی بوده که در محل التهاب وارد می‌شوند و از اجزای مهم سیستم دفاعی ذاتی محسوب می‌گردند . همچنین با عرضه‌ی مواد ضدمیکروبی داخل و خارج سلولی، از انتشار طیف وسیعی از پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کنند (Kumari and Sahoo 2006). انفجار تنفسی متعاقب حمله سلول‌های بیگانه خوار به عوامل بیماری‌زای مهاجم، در طی فرایند بیگانه خواری صورت می‌گیرد (Dalmo et al. 1997). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲، محققان به این نتیجه رسیدند که میزان احیای NBT در کپور ماهیان تغذیه شده با کاروتنوئید استخراج شده از پوسته‌ی میگو، به طور

معنی‌داری افزایش یافت زیرا پوسته‌ی میگو غنی از کاروتنوئید آستاگزانتین بوده و فعالیت آنتی اکسیدانی قوی دارد. آن‌ها نشان دادند که میزان ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از کاروتنوئید تمام فاکتورهای ایمنی را افزایش داده و همچنین باعث محافظت ماهیان در برابر عفونت ایجاد شده توسط *آئروموناس هیدروفیلا* می‌شود (Sowmya and Sachindra 2012). در بررسی حاضر، مشاهده شد که فعالیت انفجار تنفسی توسط گلبول‌های سفید ماهی ماکرو تغذیه شده با جلبک به میزان ۱۵ گرم در کیلوگرم، دارای بیش‌ترین میزان بود. به طور کلی در این مطالعه بهبود سیستم ایمنی در تیمارهای تغذیه شده با جلبک دیده شد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیش‌تری روی این جلبک و سایر جلبک‌های دریایی به منظور بررسی اثرات آن‌ها بر سیستم ایمنی ماهیان زینتی و پرورشی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح گرنت انجام گردیده است و از اعطای گرنت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

صمصام شریعت، سیدهادی (۱۳۷۱). عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آن‌ها. چاپ اول، انتشارات مانی اصفهان، صفحات ۲۰-۸.

مرادی، سیدحسین و لهراسبی، سهیلا (۱۳۸۸). اطلس ماهیان آب شیرین. انتشارات علمی آبزیان، صفحات ۳۰-۶۸.

Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T. (2004). Enhancement of innate immunity in reinbow trout (*Oncorhynchusmykiss*, Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology, 16: 527-537.

Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T. (2000). Effects of β-carotene on the immune response of rainbow trout, *Onchorhyncus mykiss*. Fisheries Science 66, 1068-1075.

Balcazar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J.L. and Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278: 188-191.

Bell, J.G.; McEvoy, J.; Tocher, D.R. and Sargent, J.R. (2000). Depletion of α-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. The Journal of Nutrition, 130(7): 1800-1808.

Brata, O. (1993). Veterinary Clinical Immunology laboratory, Bar- Lab Inc, Vol2, Section 3: 24-25.

Bricaud, A.; Morel, A.; Babin, M.; Allali, I.K. and Claustre, H. (1998). Variations of light absorption by suspended particles with chlorophyll α concentration in oceanic (case 1) waters: analysis and implications for bio-optical models. Journal Geophysical Research. 103(13): 31033-31044.

Chew, B.P. and Park, J.S. (2004). Carotenoid action on the immune response.Journal of Nutrition 134, 257S-261S.

Costa, M.M.; Oliveira, S.T.L.; Balen, R.E.; Bueno Junior, G.; Baldan, L.T.; Silva, L.C.R. and Santos, L.D. (2013). Brown Seaweed meal to nile tilapia fingerlings, Archivos de Zootecnia. 62 (237): 101-109.

Dalmo, R.A.; Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. (1997). Non-spcific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Disease, 20: 241-273.

Divyagnaneswari, M.; Christybapita, D. and Dinakaran, R. (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum*leaf fractions. Fish and Shellfish Immunology, 23: 249-259.

Elseady, Y. and Zahran, E. (2013). Ameliorating effect of β-carotene on antioxidant response and hematological parameters of mercuric chloride toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Physiology and Biochemistry 39, 1031-1041.

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

Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C. (2000). Schalm Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York, P: 1120-1124.

Flores-Miranda, M.A.C.; Luna, A.; Campa-Cordova, A.I.; Gonzalez-Ocampo, H.A.; Fierro-Coronado, J.A. and Partida-Arangure, B.O. (2011). Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with Vibrio sinaloensis strains. Aquaculture, 320: 51-55.

Garcia-Chavarria, M. and Lara-Flores, M. (2013). The use of carotenoid in aquaculture. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 8(2): 38-49.

Hashim, M.A. and Chu, K.H. (2004). Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. Chemical. Engineering Journal, 97: 249-255.

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

Kumari, J. and Sahoo, P.K. (2006). Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Diseases of Aquatic Organisms; 70: 63-70.

Lall, S.P. and Olivier, G. (1993). Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish. In: INRA Ed., Fish Nutrition in Practice (Les Collogues). 61: 101-118.

Miyazaki, T. (1998). A simple method to evaluate respiratory burst activity of blood phagocytes from Japanese flounder. Fish Pathology, 33: 141-142.

Mukherjee, A.; Mandal, B. and Banerjee, S. (2011). Role of plant based natural carotenoids on feeding, growth and colouration of fish: a case study. In: Carotenoids:Properties, Effects and Diseases (ed. by M. Yamaguchi), Pp: 179–187. Nova Science Publishers, New York.

Ortuno, J.; Esteban, M.A. and Meseguer, J. (2000). High dietary intake of α-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology 10, 293-307.

Pallela, R.; Na-Young, Y. and Kim, S.K. (2010). Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms, Marine Drugs, 8: 1189-1202.

Prasad, G. and Priyanka, G.L. (2011). Effect of fruit rind extract of *Garcinia gummi-gutta* on haematology and plasma biochemistry of catfish *Pangasinodon hypophtalamus*. Asian. Journal of Biochemistry 6: 240-251.

Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C. (1999). Influence of the immunostimulant chitosan on immune response of healthy and cortisol-treated rohu (Labeo rohita). Journal of Aquaculture in the Tropics, 14: 209–215.

Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M. (1993). Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of bovine lactoferin. Journal of Fish Diseases, 16: 239-247.

Secombes, C.J.; Zou, J.; Laing, K.; Daniels, G.D. and Cunningham, C. (1998). Cytokine genes in fish. Aquaculture, 172: 93-102.

Sheikhzadeh, N. (2013). Influence of dietary vegetable crops on rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) immune system and growth performance.Acta Scientiae Veterinariae41 (Pub. 1109), 1-6.

Sowmya, R. and Sachindra, N.M. (2011). Carotenoids inaquatic resources: occurrence, recovery, applicationand biofunctions. In: Carotenoids: Properties, Effects and Diseases (ed. by M. Yamaguchi), Pp: 75-118. Nova Science Publishers, New York.

Sowmya, R. and Sachindra, N.M. (2012). Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in-vitro assays and in membrane model system. Food Chemistry, 134: 308-314.

Tassakka, A.C.M.A.R. and Sakai, M. (2003). The in vitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio*. L. Aquaculture, 220: 27-36.

Thrall, M.A. (2004).Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Whiliams & Wilkins, New York, 241, 277-288, 402.

Torrissen, O.J. (1984). Pigmentation of salmonids: effects of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. Aquaculture, 43: 185-193.

Villamil, L.; Figueras, A. and Novoa, B. (2003). Immunomodulatory effects of nisin in turbot (Scophthalmusmaximus L.). Fish and Shellfish Immunology, 14: 157-169.

Vinkler, M.; Svobodova, J.; Marsik, P. and Albrecht, T. (2011). Carotenoids and health signaling in animals.In:Carotenoids: Properties, Effects and Diseases (ed. by M. Yamaguchi), Pp: 189-234. Nova Science Publishers, New York.

Watanuki, H.; Ota, K.; Tasaakka, A.C.M.A.R.; Kato, T. and Sakai, M. (2006). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 258: 157-163.

White, D.A.; Moody, A.J.; Serwata, R.D.; Bowen, J.; Soutar, C.; Young, A.J. and Davies, S.J. (2003). The degree of carotenoid esterification influences the absorption of astaxanthin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Nutrition, 9: 247-251.

Wozniake, M. (1996). The Role of carotenoids in fish. Protectio Aquarum Et Piscatoria, 22: 65-75.

Effect of feeding diets containing ethanol extract of algae, *Sargassum angustifolium* on some blood and immune factors in Macro (*Labidochromis caeruleus*)

Tulaby Dezfuly, Z.[1]; Mesbah, M.[2]; Peyghan, R.[3]; Mohammadian, T.[4] and Bita, S.[5]

Received: 06.09.2015 Accepted: 23.04.2016

Abstract

It seems that the natural immune stimulants such as herbal extracts containing carotenoids, especially algae, is the most practical method to prevent fish disease. Immune stimulants by enhancing the innate immune system can prevent the occurrence of infectious diseases. Dietary with carotenoids, has improved the immune system in many laboratory animals. In order to investigate the effect of alcoholic extract of *Sorgassum angustifolium*, 120 pieces of fish were randomly divided into four groups (each aquarium containing 30 piece fish, 6.5 ±0.65gr) and for 60 days for doing the experiment were maintenanced and fed. The fourth treatment was the control group that only received commercial food (Biomar) was coated with olive oil. First, second and third groups were fed with of 5, 10 and 15 g/kg ethanol extract *S. angustifolium* for two months. After 60 days, the fish were anesthetized and blood samples were taken for hematological and immunological studies. Among the different treatments, the highest rate of PCV, Hb and MCHC was observed in treatment that fed 5g/ kg algae ($p<0.05$). The number of white blood cells in all treatments were fed with algae was more than the control group, but this difference was not significant ($p>0.05$). NBT activity in the serum of treatment fed with 15g/kg *S. angustifolium* algae was more than the other treatments and the control group ($p<0.05$). Complement activity in groups that fed with 10 and 15g/ kg alcoholic extract of algae in day 60, was significantly higher than the control group ($p<0.05$). Serum bactericidal power in treatments that fed with alcoholic extract of algae, compared to other treatments and control group showed no significant difference ($p>0.05$). According to the results of the present study, oral administration of ethanol extract of *S. angustifolium* stimulate some nonspecific immune factors in Macro fish.

Key words: Alcoholic extract, *Sargassum angustifolium,* Blood factors, Immune system, Macro fish, Carotenoid

1- PhD Student of Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
5- Graduated student of Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Tulaby Dezfuly, Z., E-mail: zahratulaby@yahoo.com