13 (1) 319-324, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

## Original Research Paper

# Investigation of some mucosal and serum indices in exposed common carp (*Cyprinus carpio*) with salinity stress

***Sepideh Ghani*, Abdolmajid Haji Moradlou, Hamed Paknejad, Marzieh Abulfathi***

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*

**Key Words**

Salinity stress
Aquatic
Mucus indices
Serum indices

## Abstract

**Introduction:** The present study was conducted to evaluate some of the mucosal and serum indices of common carp (*Cyprinus carpio*) that exposed to salinity stress.

**Materials & Methods:** In this regard one hundred and eighty fish (mean weight 50±0.62 gr) were obtained from, after two weeks of adaptation randomly stocked in nine tank assigned to three treatments with three replicates including fresh water, Caspian Sea water (14 ppt) and 50% sea water and 50% fresh water (7 ppt). For measurement of immune factors after 3, 6 and 9 days of exposure, nine fish were taken from each treatment and anesthesia with clove powder. Serum and mucus were collected from different treatment and stored at -20 ℃ until use.

**Result:** The results showed different salinity had a significant effect on total protein, alkaline phosphatase and lysozyme of serum and mucosal ($P<0.05$). But there wasn't significant effect on protein content of mucus among treatments.

**Conclusion:** According to the overall conclusion of the present study, results showed that mucusal lysozyme decreased with increase of water salinity in all measuring periods, but the amount of mucosal alkaline phosphatase in initial days decrease in 7 ppt salinity and in final days increase in 14 ppt salinity treatment, but serum alkaline phosphatase in first days of exposure to salinity decreased and then increase during experiment period. Total protein of mucus didn't statistically affect during experiment. Serum total protein in initial days of exposure, increase and decrease during experiment. increased in the early and final days of sea water treatment. There was no significant difference among protein content of mucus in all treatment. The lysozyme and total protein parameters of the blood serum increase in the early days of exposure to salinity stress, but during the exposure total protein content of the serum reduced. The amount of alkaline phosphatase decrease in the early days of exposure to salinity stress, but increases with salt in time.

* Corresponding Author's email: sepidgh333h@yahoo.com
Received: 3 May 2019; Reviewed: 10 September 2019; Revised: 22 October 2019; Accepted: 8 November 2019
(DOI): 10.22034/aej.2020.133912

**مقاله پژوهشی**

# بررسی برخی شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم و موکوس پوست ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با تنش شوری

**سپیده غنی *، عبدالمجید حاجی‌مرادلو، حامد پاک‌نژاد، مرضیه ابوالفتحی**

*گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*

**کلمات کلیدی**

تنش شوری
آبزی
شاخص‌های موکوس
شاخص‌های سرم

**چکیده**

**مقدمه:** تحقیق حاضر جهت ارزیابی برخی شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم و موکوس پوست ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با تنش شوری صورت گرفت.

**مواد و روش‌ها:** بدین منظور ۱۸۰ قطعه بچه ماهی کپور با میانگین وزن۰/۶۲±۵۰ گرم تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید فضلی‌برآبادی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه گرگان انتقال یافت. پس از دو هفته آداپتاسیون، آزمایش در قالب ۳ تیمار شامل تیمار آب شیرین (شوریppt ۰)، تیمار حاوی مخلوط ۵۰ درصد آب شور و ۵۰ درصد آب شیرین تیمار آب شور دریا ی خزر (شوریppt ۷) و (شوری ppt ۱۴) انجام شد. جهت بررسی شاخص‌های ایمنی ذاتی (پروتئین محلول، فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم) در پاسخ به تنش شوری، نمونه‌برداری از سرم و موکوس پوست در سه مرحله مجزا شامل روز سوم، روز ششم و روز نهم بعد از در معرض قرارگیری با شوری‌های مختلف انجام گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که تغییرات شوری تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین کل، فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم سرم و موکوس ماهی داشت ($P<0/05$) ولی تغییرات شوری تاثیر معنی‌داری بر غلظت پروتئین محلول موکوس پوست ماهی نداشت ($P>0/05$).

**نتیجه‌گیری و بحث:** نتیجه‌گیری کلی تحقیق حاضر نشان داد که میزان لیزوزیم موکوس با افزایش شوری در همه دوره‌ها کاهش یافت. میزان لیزوزیم سرم در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، افزایش یافت ولی با گذشت زمان میزان این شاخص نسبت به ابتدای دوره کاهش یافت. میزان فسفاتاز قلیایی موکوس در روزهای ابتدایی در آب لب‌شور و در روزهای انتهایی در آب شور افزایش یافت ولی میزان آلکالین فسفاتاز سرم در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، کاهش و با گذشت زمان افزایش یافت. میزان پروتئین محلول موکوس طی دوره‌های مختلف شوری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی پروتئین کل سرم خون در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، افزایش یافت ولی با گذشت زمان میزان این شاخص نسبت به ابتدای دوره کاهش یافت.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sepidgh333h@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳ اردیبهشت ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۱۹ شهریور ۱۳۹۸؛ تاریخ اصلاح: ۳۰ مهر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۷ آبان ۱۳۹۸
(DOI): 10.22034/aej.2021.133912

## مقدمه

گونه‌های آبزی‌پروری اغلب در معرض حجم عظیمی از استرس‌ها هستند که منجر به سرکوب ایمنی، کاهش نرخ رشد و افزایش حساسیت به بیماری می‌شود. کاهش استرس یکی از اهداف پرورش دهندگان ماهی در جهت تولید بیش‌تر می‌باشد. شوری یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که تغییرات آن بقا، سوخت و ساز و پراکنش ماهیان را طی تکامل تحت تأثیر قرار می‌دهد پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیکی اغلب به‌منظور ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان و به عنوان شاخص استرس استفاده می‌شوند ماهیان به‌دلیل خونسرد بودن به‌شدت به محیط خود وابسته بوده و شرایط محیطی می‌تواند بر فیزیولوژی بدن آن‌ها تاثیر بگذارد. استرس ناشی از تغییرات محیطی (شوری، pH، دما، آمونیاک و ...) می‌تواند بر پارامترهای خونی و فاکتورهای‌ایمنی تاثیر بگذارد(Martinez-Alvarez وهمکاران، ۲۰۰۲). از عملکرد عمده پروتئین‌ها می‌توان به تنظیم فشار اسمزی خون، انتقال ترکیبات داخلی و خارجی مانند اسیدهای چرب آزاد، هورمون‌ها و داروها اشاره کرد (Varsamos و همکاران، ۲۰۰۵). ساختار پوست ماهی از لحاظ بافت‌شناسی با پوست پستانداران بسیار متفاوت بوده و قادر به ترشح موکوسی است که به‌عنوان جزو اصلی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود (Salinas و همکاران، ۲۰۰۱). موکوس اپیدرم توسط سلول‌های جامی‌شکل ترشح و متشکل از آب و گلیکوپروتئین‌های با وزن مولکولی بالا می‌باشد، خاصیت ضدمیکروبی موکوس ناشی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و مکانیکی آن می‌باشد. یعنی علاوه بر این‌که با تولید و ترشح مداوم از تشکیل کلونی توسط انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها روی سطح بدن جلوگیری می‌کند، حاوی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی متعددی ازجمله لیزوزیم، لکتین، اینترفرون، ویتلوژنین، ایمنوگلوبولین‌ها، فاکتورهای مکمل، فسفاتاز قلیایی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی دیگر می‌باشد که وجود آن در چندین گونه ماهی اثبات شده است. حتی به‌نظر می‌رسد کارایی برخی از این ترکیبات ازجمله لیزوزیم و عوامل مکمل در ماهی قوی‌تر از پستانداران باشد (Subramanian و همکاران، ۲۰۰۸). میزان پروتئین کل در موکوس نشان‌دهنده میزان ترشح و یا میزان موکوس موجود است. افزایش سطح پروتئین‌های موکوس به‌عنوان شاخص مناسبی برای وضعیت ایمنی غیراختصاصی ماهیان مطرح است (Adel و همکاران، ۲۰۱۴). باتوجه‌به این‌که شوری یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که تغییرات آن بقا، سوخت و ساز و پراکنش ماهیان را طی تکامل تحت تأثیر قرار می‌دهد، هم‌چنین استرس شوری می‌تواند مانع بزرگی در جهت تولید ماهیان و بر وضعیت فیزیولوژیک و سلامت ماهیان اثرگذار بوده و باعث کاهش عملکرد ایمنی ماهیان می‌شود. با توجه به این‌که مطالعات کمی در زمینه استرس شوری بر روی شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس صورت گرفته است. این تحقیق به بررسی برخی شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم و موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با تنش شوری صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

**طرح کلی آزمایش:** این آزمایش از آذر تا اسفند ۱۳۹۷ انجام شد. بدین‌منظور ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی کپور با میانگین وزن ۰/۶۲±۵۰ گرم تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید فضلی‌برآبادی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافت. پس از دو هفته تطابق با شرایط محیطی، آزمایش در قالب ۳ تیمار شامل تیمار آب‌شیرین (شوری۰ppt)، تیمار حاوی مخلوط ۵۰ درصد آب لب‌شور دریای خزر و ۵۰ درصد آب شیرین (شوری۷ ppt) و تیمار آب لب‌شور دریای خزر (شوری ۱۴ ppt)، طی ۹ روز انجام شد. هر تیمار شامل سه حوضچه حاوی ۶۰ قطعه ماهی با میانگین وزن ۰/۶۲±۵۰ گرم بود. ماهیان در طی دوره آزمایش ۲ بار در روز با غذای تجاری شرکت فرادانه تغذیه شدند. پارامترهای کیفی آب از جمله pH (۷/۹-۶/۷)، اکسیژن محلول (۹-۷ میلی‌گرم در لیتر) و سختی آب ۲۱۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم در لیتر دو بار در هفته اندازه‌گیری و در حد قابل قبول برای ماهی کپورمعمولی حفظ شدند. هم‌چنین تعویض آب هر یک روز در میان در طول دوره آزمایش صورت گرفت.

**نمونه‌برداری از خون و موکوس پوست:** جهت بررسی شاخص‌های ایمنی ذاتی بچه‌ماهیان کپورمعمولی در پاسخ به تنش شوری، نمونه‌برداری از سرم و موکوس پوست در سه مرحله مجزا شامل روز سوم، روز ششم و روز نهم بعداز درمعرض قرارگیری با شوری‌های مختلف انجام گرفت.

**نمونه‌برداری از موکوس:** جمع‌آوری موکوس مطابق با روش Sabramanian و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. پس از مشاهده وضعیت عمومی هر ماهی و اطمینان از سالم بودن آن‌ها، تعداد ۹ عدد ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی صید و با استفاده از محلول گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش و به کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۵ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار منتقل شدند. سپس کیسه‌ها را به‌آرامی به‌مدت ۲-۱ دقیقه تکان داده و پس از جمع‌آوری موکوس، ماهی‌ها به مخازنی بازیابی برگردانده شدند. سپس نمونه‌های موکوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور g ۱۵۰۰ سانتریفوژ و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

**نمونه‌برداری از خون:** ۹ عدد ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمار صید و پس از بی‌هوشی با محلول گل‌میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، خونگیری از سیاهرگ دمی با استفاده از سرنگ غیرهپارینه انجام شد.

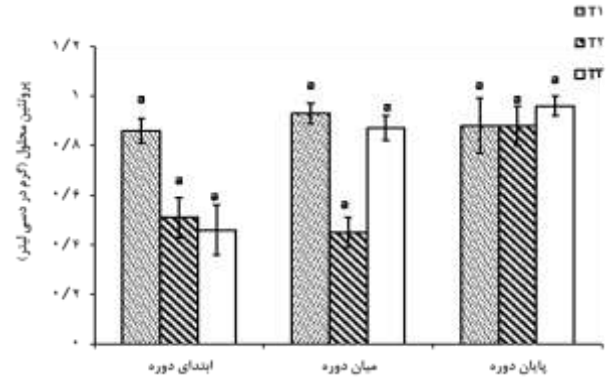
سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شد (۳۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه) و سرم با استفاده از سمپلر جداسازی و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

**اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی ذاتی**: غلظت پروتئین محلول موکوس هر ماهی با استفاده از روش Lowry (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری شد. فعالیت لیزوزیم به‌روش کدورت‌سنجی با استفاده از باکتری میکروکوکوس لوئوس به‌عنوان سوبسترا تعیین شد. به‌طور خلاصه، ۲۵۰ میکرولیتر نمونه موکوس به کووت‌حاوی ۱/۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس در بافر استات سدیم (۰/۰۲ مولار، pH =۵/۵) اضافه و کاهش در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. کاهش جذب در دقیقه حداقل باید ۰/۰۰۱ باشد. یک واحد فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کاهشی معادل ۰۰۱/ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکووس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان می‌شود(Kumari و همکاران، ۲۰۰۶).فعالیت‌فسفاتاز قلیایی با استفاده از کیت شرکت زیست‌شیمی انجام شد. اختلاف‌جذب نوری به‌مدت ۳ دقیقه در فواصل ۱ دقیقه‌ای در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و میزان فعالیت آنزیم مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه شد.

**تجزیه وتحلیل داده‌ها**: پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنف، آنالیز آماری داده‌ها به‌کمک نرم‌افزار SPSS و بااستفاده‌ازآزمون آنالیزواریانس یک‌طرفه ( ANOVA-one way) انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان α =۰/۰۵ استفاده شد.

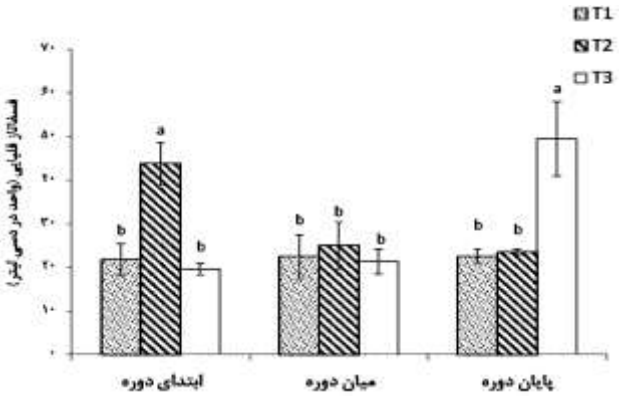
## نتایج

**پارامترهای‌ایمنی‌موکوس‌پوست:**نتایج نشان داد که تغییرات شوری تاثیر معنی‌داری بر غلظت پروتئین محلول موکوس پوست بچه ماهی کپور در طی دوره‌های مختلف آزمایش نداشت (P>۰/۰۵) (شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم موکوس پوست ماهیان تیمار شوری ppt ۰ درطی‌دوره آزمایش تغییر معنی‌داری نشان نداد. در تیمار شوری ppt ۷، میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم در روز ششم آزمایش در مقایسه با روز سوم کاهش یافت (P<۰/۰۵)و تا پایان دوره (روز نهم) تغییر معنی‌داری نکرد (P>۰/۰۵)، درحالی‌که در تیمار شوری ppt ۱۴ میزان فعالیت این آنزیم‌ها در پایان دوره آزمایش (روز نهم) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) (شکل‌های ۲ و ۳). در روز سوم آزمایش، میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی در تیمار ppt ۷ در مقایسه با تیمار ppt ۰ و ppt ۱۴ بالاتر بود (P<۰/۰۵) ، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمار ppt ۰ و ppt ۱۴ مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در روز ششم آزمایش، اختلاف معنی‌داری در فعالیت فسفاتاز قلیایی سه گروه آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، درحالی‌که در پایان دوره آزمایش(روز نهم)،میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی در تیمار T3 به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار ppt ۰ و ppt ۷ بود (P<۰/۰۵) (شکل ۲). در سرتاسر دوره آزمایش، پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم مربوط به تیمار ppt ۱۴ بود (P<۰/۰۵)، درحالی‌که اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آنزیم در تیمار ppt ۰ و ppt ۷ مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۳).




**شکل۱: غلظت پروتئین محلول موکوس پوست بچه‌ماهی کپورمعمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب‌شیرین، T2: تیمار مخلوط آب‌شور دریای خزر و آب‌شیرین، T3: تیمار آب شور دریای خزر.**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α =۰/۰۵).

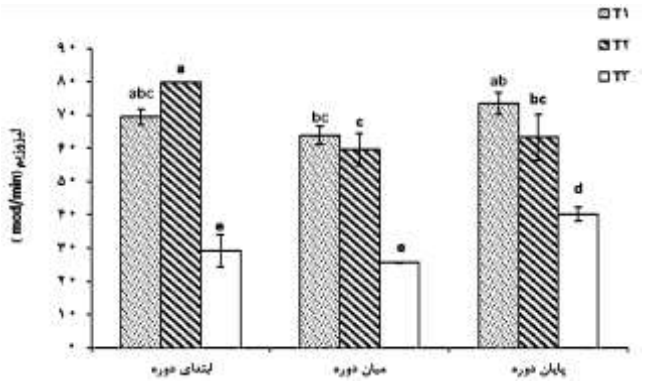



**شکل۲. غلظت فسفاتاز قلیایی موکوس پوست بچه‌ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب‌شیرین، T2: تیمارمخلوط آب‌شور دریای خزر و آب شیرین، T3: تیمار آب‌شور دریای خزر.**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α =۰/۰۵).

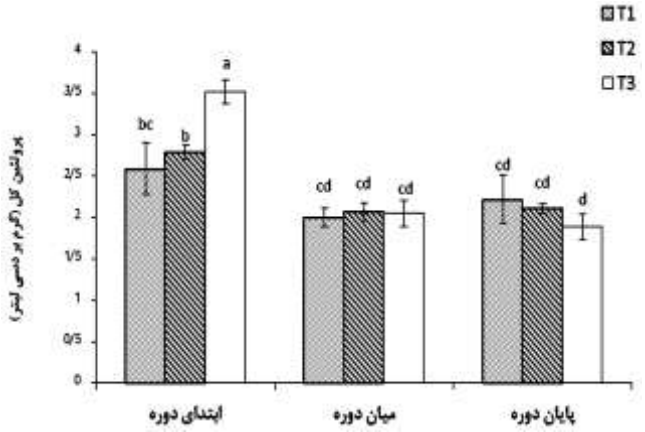
**پارامترهای ایمنی سرم خون:** غلظت پروتئین محلول سرم خون بچه‌ماهی کپورمعمولی در هر سه تیمار آزمایشی در روز ششم آزمایش کاهش یافت (P<۰/۰۵) تا پایان دوره آزمایش (روز نهم) ثابت ماند (P>۰/۰۵). هر چند این کاهش در مورد ماهیان تیمار ppt ۰

معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بالاترین میزان غلظت پروتئین محلول در روز سوم آزمایش مربوط به تیمار ppt ۱۴ بود (P<۰/۰۵)، درحالی در روزهای ششم و نهم آزمایش، اختلاف معنی‌داری در غلظت پروتئین محلول تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۴).




**شکل۳: غلظت لیزوزیم موکوس پوست بچه‌ماهی کپورمعمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب شیرین، T2: تیمار مخلوط آب شور دریای خزر و آب شیرین، T3: تیمار آب شور دریای خزر.**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α =۰/۰۵).

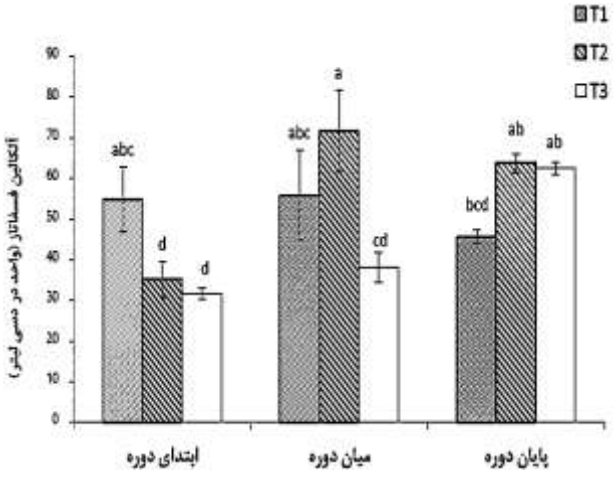



**شکل ۴: غلظت پروتئین کل سرم بچه‌ماهی کپورمعمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب شیرین، T2: تیمار مخلوط آب شور دریای خزر و آب شیرین، T3: تیمار آب شور دریای خزر.**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α =۰/۰۵).

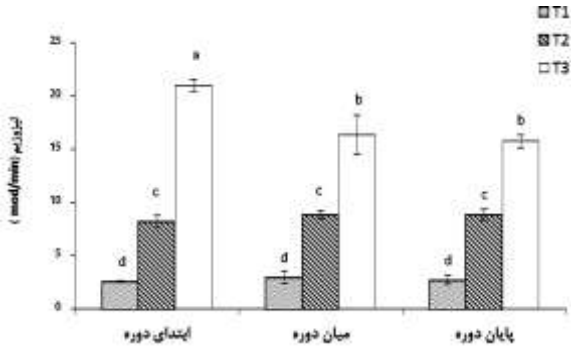
میزان‌فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی سرم درتیمار ppt ۱۴ در طی دوره آزمایش به‌تدریج افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). در تیمار ppt ۷،میزان فعالیت‌آنزیم در روز سوم آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) اما در روز نهم میزان آن کاهش یافت، اما معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی تیمار ppt ۰ تغییر معنی‌داری‌را درطی‌دوره آزمایش نشان‌نداد (P>۰/۰۵)(شکل ۵).

در روز سوم آزمایش، بالاترین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی مربوط به تیمار ppt ۰ بود (P<۰/۰۵) و اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم بین تیمار ppt ۷ و ppt ۱۴ مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، درحالی‌که در روز نهم آزمایش،تیمار ppt ۰ پایین‌ترین‌میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را به‌خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). در روز ششم آزمایش، پایین‌ترین و بالاترین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به‌ترتیب مربوط به تیمار ppt ۱۴ و ppt ۷ بود (P<0/۰۵)(شکل ۵). میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم ماهیان تیمارهای ppt ۰ و ppt ۷ در طی دوره آزمایش ثابت باقی ماند (P>۰/۰۵)، درحالی‌که در تیمار ppt ۱۴، میزان‌فعالیت آنزیم‌در روز ششم آزمایش به‌طورمعنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)ومیزان آن تا پایان‌دوره آزمایش‌پایین باقی ماند (P>۰/۰۵). در سرتاسر دوره آزمایش، بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ppt ۱۴ و ppt ۰ بود (P<۰/۰۵) (شکل ۶). میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم ماهیان تیمارهای ppt ۰ و ppt ۷ در طی دوره آزمایش ثابت باقی ماند (P>۰/۰۵)، درحالی که در تیمار ppt ۱۴، میزان فعالیت آنزیم در روز ششم آزمایش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) و میزان آن تا پایان دوره آزمایش پایین‌باقی‌ماند(P>۰/۰۵).درسرتاسردوره‌آزمایش،بالاترین‌وپایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ppt ۱۴ و ppt ۰ بود (P<۰/۰۵)(شکل ۶).




**شکل۵: غلظت فسفاتاز قلیایی سرم بچه‌ماهی کپورمعمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب شیرین، T2: تیمار مخلوط آب شور دریای خزر و آب شیرین، T3: تیمار آب شور دریای خزر.**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α =۰/۰۵).




**شکل۶: غلظت لیزوزیم سرم بچه‌ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی. T1: تیمار آب شیرین، T2: تیمار مخلوط آب شور دریای خزر و آب شیرین، T3: تیمار آب شور دریای خزر**

مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($\alpha$ =۰/۰۵).

## بحث

وجود موکوس بر پوست و آبشش ماهی جهت حفاظت از ساختار آبشش و برخی وظایف مهم آن حیاتی است. موکوس پوست حاوی شاخص‌های ایمنی ذاتی مانند پروتئین‌های مکمل، لیزوزیم، ایمونو گلوبولین، پروتئاز و لکتین است. کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای تنش‌زا در قبل یا در زمان نمونه‌برداری موکوس است (Ángeles Esteban، ۲۰۱۲). حضور لیزوزیم در موکوس پوست تایید کننده نقش فعال آن در گونه‌های ماهی به‌عنوان کاهش‌دهنده عوامل بیماری‌زا است (Nigam و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیق حاضر، در ابتدای دوره (پس از گذشت ۳روز) میزان لیزوزیم موکوس با افزایش شوری ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. هم‌چنین با گذشت زمان میزان این شاخص در میان‌دوره نسبت به ابتدای دوره کاهش و سپس در پایان دوره دوباره افزایش یافت. در مطالعه‌ای که توسط Taylor و همکاران (۲۰۰۷) روی قزل‌آلا صورت گرفت، نشان داده شد که با انتقال به آب دریا فعالیت لیزوزیم کاهش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. میزان لیزوزیم سرم در تحقیق حاضر، با افزایش شوری در همه دوره‌ها افزایش یافت در کل میزان لیزوزیم سرم در گذر زمان نسبت به ابتدای دوره کاهش یافت. مطابق نتایج تحقیق حاضر Dominguez و همکاران (۲۰۰۴)، اثر تغییرات محیطی بر پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی ماهی نیل تیلاپیا را بررسی کردند و نشان دادند که افزایش شوری، باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرمی خون این ماهی می‌شود. در مطالعه دیگری Taylor و همکاران (۲۰۰۷) پاسخ ایمنی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را پس از انتقال از آب‌شیرین به آب شور را بررسی کردند و نشان دادند که لیزوزیم سرم افزایش می‌یابد که مطابق نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

فسفاتاز قلیایی به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی عمل می‌کند و مقدار آن در شرایطی مانند مراحل اولیه بهبود زخم‌ها، شرایط تنش‌زا به دلیل نقش حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد (Palaksha و همکاران، ۲۰۰۸). موکوس کپورمعمولی بیش‌ترین سطوح فسفاتاز قلیایی را دارد که به‌علت زیستگاه این ماهی در آب‌های کم عمق و نزدیک بستر و تحت شرایط گل آلود است و حضور این آنزیم در جهت افزایش مقاومت سیستم ایمنی ذاتی این ماهی می‌باشد (Sabramanian و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه حاضر، با افزایش شوری آب میزان این شاخص افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) که افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند به‌علت پاسخ ایمنی موکوس پوست تحریک شده باشد (Roosta و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج این تحقیقات با مطالعه حاضر هم‌سو می‌باشد. در تایید این یافته Palikova و همکاران (۲۰۱۰) تعیین کردند که افزایش مقادیر فسفاتاز قلیایی نشان‌دهنده ترشح ناقص صفرا بوده که ناشی از پایین بودن غذای خورده شده می‌باشد که ممکن است مرتبط با بالا بودن استرس در ماهی باشد و افزایش شوری می‌تواند یکی از عوامل استرس‌زا قلمداد گردد. فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شاخص بالقوه استرس است که در موکوس پوست سالمون آتلانتیک به اثبات رسیده است (Ross و همکاران، ۲۰۰۰). آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌عنوان شاخص بالقوه استرس در هنگام دفاع در مقابل پاتوژن‌ها و یا بهبود زخم‌های سطح بدن ماهی به اثبات رسیده است. تغییر در میزان فعالیت و ترشح این آنزیم می‌تواند متاثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Ross، ۲۰۰۰). در مطالعه حاضر، میزان فسفاتاز قلیایی سرم با گذشت زمان کاهش یافت. این شاخص در ابتدا در مواجهه با شوری کاهش و با گذشت زمان با افزایش شوری میزان آن افزایش داشت. پروتئین‌ها مهم‌ترین ترکیبات سرم خون هستند. آلبومین و گلوبولین مهم‌ترین ترکیبات سرم خون می‌باشند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۵). پروتئین خون از اساسی‌ترین اجزاء متابولیسم در آبزیان است و غلظت کل پروتئین موجود در سرمی خون به‌عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگانیسم‌های آبزی به‌کار برده می‌شود و سنجش مقدار پروتئین خون می‌تواند آسیب‌های سلولی را پیش‌بینی کند (Riche، ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر تیمارهای آزمایشی بر میزان پروتئین محلول موکوس ماهی تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) ولی بر میزان پروتئین کل سرم خون ماهی تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان این شاخص با گذشت زمان کاهش یافت با افزایش شوری در ابتدای دوره میزان آن افزایش و با گذشت زمان در مواجهه با شوری کاهش یافت. میزان پروتئین کل سرم ممکن است به‌عنوان منبع انرژی در شرایط استرس در ماهیان مورد استفاده قرار گیرد (Almeida و

همکاران، ۲۰۰۵). اگرچه در مطالعات مختلف نتایج متفاوتی در مورد میزان پروتئین خون شامل کاهش، افزایش و یا ثبات در شرایط استرس گزارش شده است (Sadhu و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که تغییرات فیزیولوژیک ماهیان تحت شرایط استرس، ویژگی‌های زیستی هر گونه، منابع انرژی در دسترس می‌توانند اثرات متفاوتی بر استفاده از منابع انرژی در بدن ماهیان داشته باشند. پروتئین کل سرم که (به‌جز در ابتدای دوره) تحت تاثیر استرس شوری قرار نگرفتند به‌عنوان شاخص نشان‌دهنده استرس‌شوری در این گونه مفید نیستند. فاکتورهای متعددی مانند سن، جنسیت، اندازه، محیط و شرایط فیزیولوژیکی بر پاسخ‌های هماتولوژیکی در ماهیان اثر می‌گذارند (Sowunmi، ۲۰۰۳). به‌طورکلی اتفاق نظر محققین بر این است که فاکتورهای موکوس و سرم ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته، ارتباط و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و ... دارد. نتیجه‌گیری کلی تحقیق حاضر نشان داد که میزان لیزوزیم موکوس با افزایش شوری در همه دوره‌ها کاهش یافت. میزان لیزوزیم سرم در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، افزایش یافت ولی با گذشت زمان میزان این شاخص نسبت به ابتدای دوره کاهش یافت. میزان فسفاتاز قلیایی موکوس در روزهای ابتدایی در آب لب‌شور و در روزهای انتهایی در آب شور افزایش یافت ولی میزان آلکالین فسفاتاز سرم در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، کاهش و با گذشت زمان افزایش یافت. میزان پروتئین محلول موکوس طی دوره‌های مختلف شوری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی پروتئین کل سرم خون در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، افزایش یافت ولی با گذشت زمان میزان این شاخص نسبت به ابتدای دوره کاهش یافت.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت.از همه بزرگوارانی که به‌نحوی در این پژوهش مساعدت نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

## منابع

۱. **عبدلی، ا. و نادری، م.، ۱۳۸۷.** تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. تهران. انتشارات علمی آبزیان. ۲۴۴ صفحه.

۲. **علیشاهی، م.؛ سلطانی، م.؛ مصباح، م. و اسمعیلی‌راد، ا.، ۱۳۹۰.** تأثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۶ ، شماره ۳، صفحات ۲۵۵ تا ۲۶۳.

۳. **نعمت‌الهی، م.ع.، ۱۳۸۹.** پاسخ به استرس اسارت در تور در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). مجله شیلات، نشریه منابع طبیعی ایران. دوره ۶۳ ، شماره ۱، صفحات ۳۹ تا ۴۷.

4. **Adel, M.; Safari, R.; Nematolahi, A.; Yeganeh, S. and Ahmadvand, S., 2014.** Effect of different levels of Grobiotic A probiotic on antibacterial activity and some immune parametrose of *Huso huso*. Exploitation and aquaculture Jurnal. Vol. 3, No. 33, pp: 99-110. (in persian).
5. **Almeida, J.S.; Meletti, P.C. and Martinez, C.B., 2005.** Acute effects of biochemical parameters of the neotropical fish Prochilodus lineatus. Comp Biochem Physiol. Vol. 140, pp: 356-363.
6. **Ángeles Esteban, M., 2012.** An overview of the immunological defenses in fish skin. ISRN Immunology.
7. **Austin, B. and McIntosh, D., 1988.** Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J of Fish Diseases. Vol. 11, No. 3, pp: 275-277.
8. **Caipang, C.M.E.; Brinchmann, M.F. and Kiron, V., 2009.** Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture. Vol. 295, pp: 110-115.
9. **Dominguez, M.; Takemura, A.; Tsuchiya, M. and Nakamura, S., 2004.** Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia. Aquaculture. Vol. 241, pp: 491-500.
10. **Kumar, S.; Sahu, N.P.; Pal, A.K.; Choudhury, D.; Yengkokpam, S. and Mukherjee, S.C., 2005.** Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in (*Labeo rohita)* juveniles. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 19, pp: 331-344.
11. **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J of biological chemis. Vol. 193, No. 1, pp: 265-275.
12. **Martinez-Alvarez, R.M.; Hidalgo, M.C.; Domezain, A.; Morales, A.E.; García-Gallego, M. and Sanz, A., 2002.** Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. Journal of experimental biology. Vol. 205, No. 23, pp: 3699-3706.
13. **Nigam, A.K.; Kumari, U.; Mittal, S. and Mittal, A.K., 2012.** Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 38, pp: 1245-1256.
14. **Palaksha, K.J.; Shin, G.W.; Kim, Y.R. and Jung, T.S., 2008.** Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder. Fish & shellfish immunology. Vol. 24, No. 4, pp: 479-488.
15. **Palikova, M.; Kopp, R.; Mares, J.; Navratil, S.; Kubicek, Z.; Chmelar, L.; Bandouchova, H. and Pikula, J., 2010.** Selected haematological and biochemical indices of Nile tilapia reared in the environment with cyanobacterial water bloom. Acta Veterinaria. Brno. Vol. 79, pp: 63-71.
16. **Peyghan, S. and Salamat, N., 2012.** Study of changes in the structure skine texture of *Carassius auratus* in Ahvaz city. Histobiology Veterinary Journal. Vol. 1, No. 1, pp: 1-4.
17. **Riche, M., 2007.** Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass at various salinities. Aquaculture. Vol. 264, pp: 279-284.
18. **Roosta, Z.; Hajimoradloo, A.; Ghorbani, R. and Hoseinifar, S.H., 2014.** The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. Fish physiology and biochemistry. Vol. 40, No. 5, pp: 1601-1607.
19. **Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Johnson, S.C., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Diseases of aquatic organisms. Vol. 41, No. 1, pp: 43-51.
20. **Subramanian, S.; MacKinnon, S.L. and Ross, N.W., 2007.** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 148, No. 3, pp: 256-263.
21. **Sadhu, N.; Sharma, S.R.K.; Joseph, S.; Dube, P. and Philipose, K.K., 2014.** Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass. Fish Physiol Biochem. Vol. 40, pp: 1105-1113.
22. **Sowunmi, A.A., 2003.** Haematology of the African catfish (*Clarias gariepinus*) from Eleiyele Reservoir, Ibadan South-West, Nigeria. The Zoologist. Vol. 2, No. 1, pp: 85-91.
23. **Taylor, J.F.; Needham, M.P.; North, B.P.; Morgan, A.; Thompson, K. and Migaud, H., 2007.** The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in nonsmolting rainbow trout. General and Comparative Endocrinology. Vol. 152, pp: 314-325.
24. **Varsamos, S.; Nebel, C. and Charmantier, G., 2005.** Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. Vol. 141, pp: 401-429.