13 (3) 175-180, Autumn 2021

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

Original Research Paper

Dietary effect of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) aqueous extract powder on some skin mucus immune parameters and protein pattern in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Mostafa Darvishi [1], ***Mehdi Shamsaie Mehrgan*** [1*], ***Amireghbal Khajerahimi*** [2]

[1] *Department of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Basic Sciences and Health, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Key Words
Liquorice
Mucosal immunity
Mucus protein pattern
Rainbow trout

Abstract

Introduction: Today, the use of herbal supplements based on medicinal plants in aquatic nutrition has become widespread due to their high effectiveness, availability, and environmental friendliness. Accordingly, the effects of liquorice extract powder in improving some skin mucus immune parameters of rainbow trout were studied.

Materials & Methods: 270 pieces of juveniles with an average weight of 9.46±0.11 g were distributed in 15 plastic tanks with 18 fish per tank density and after two week of adaptation to the new environmental conditions, they were fed with different levels of liquorice aqueous roots extract powder including 0 (control), 0.5, 1, 2, and 3 % for 56 days. The skin mucosal lysozyme activity was measured manually and other mucosal immune parameters were evaluated by a biochemical auto analyzer. Also, the skin mucus protein pattern was performed by vertical electrophoresis of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

Result: The results showed that lysozyme activity (15.94±0.51 U mL/min), mucosal total protein content (4.87±0.19 mg/dl), total immunoglobulin content (4.89±0.14 U/L) and activity of alkaline phosphatase enzyme (42.0±0.89 U/L) of mucus in fish fed with 2 % of liquorice treatment was higher than other experimental groups ($P<0.05$). Also, the results of skin mucus SDS-PAGE confirmed the existence of significant differences between mucosal protein units in different treatments ($p<0.05$).

Conclusion: The experimental results showed that the use of liquorice as a medicinal plant, especially at the level of 2%, can have positive effects on safety indices and protein patterns of rainbow trout skin mucus.

* Corresponding Author's email: m.shamsaie@srbiau.ac.ir
Received: 6 April 2021; Reviewed: 17 May 2021; Revised: 20 June 2021; Accepted: 18 July 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.292303.2569

مقاله پژوهشی

اثر خوراکی پودر عصاره آبی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر برخی شاخص‌های ایمنی و الگوی پروتئینی موکوس پوست بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مصطفی درویشی[1]، مهدی شمسایی‌مهرجان[1*]، امیراقبال خواجه‌رحیمی[2]

[1] گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[2] گروه علوم پایه و بهداشت، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

شیرین بیان
ایمنی موکوس
الگوی پروتئینی موکوس
قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده از مکمل‌های خوراکی برپایه گیاهان طبی در تغذیه آبزیان به‌دلایل اثربخشی بالا، دردسترس بودن و دوست‌دار محیط زیست رواج گسترده‌ای یافته است. برهمین اساس، آثار پودر عصاره ریشه گیاه شیرین بیان در بهبود برخی شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۷۰ قطعه بچه‌ماهی با وزن متوسط ۰/۱۱±۹/۴۶ گرم در ۱۵ مخزن پلاستیکی و با تراکم ۱۸ قطعه در هر مخزن توزیع و پس از دو هفته آداپتاسیون با شرایط محیطی جدید، به‌مدت ۵۶ روز با مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد پودر عصاره آبی شیرین بیان با سه تکرار تغذیه شدند. فعالیت لیزوزیم موکوس پوست به‌روش دستی اندازه‌گیری شد و سایر پارامترهای ایمنی موکوس توسط اتوآنالایزر بیوشیمیایی ارزیابی شد. هم‌چنین الگوی پروتئینی موکوس پوست با استفاده روش الکتروفورز عمودی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریلامید (SDS-PAGE) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم (۰/۵۱±۱۵/۹۴ U/میلی‌لیتر/دقیقه)، میزان پروتئین تام موکوس (۰/۱۹±۴/۸۷ میلی‌گرم/ دسی لیتر)، میزان ایمونوگلوبولین تام (۰/۱۴±۴/۸۹ U/لیتر) و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (۰/۸۹±۴۲/۰۰ U/ لیتر) موکوس پوست در ماهیان تغذیه شده با تیمار ۲ درصد شیرین بیان بیش‌تر از سایر گروه‌های آزمایشی بود ($P<0/05$). هم‌چنین نتایج SDS-PAGE موکوس وجود تفاوت معنی‌دار بین واحدهای پروتئینی موکوس پوست در تیمارهای مختلف را تایید نمود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از گیاه شیرین بیان به‌عنوان یک گیاه دارویی به‌ویژه در سطح ۲ درصد می‌تواند آثار مثبتی بر شاخص‌های ایمنی و الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.shamsaie@srbiau.ac.ir.com

تاریخ دریافت: ۱۷ فروردین ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۲۷ اردیبهشت ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۳۰ خرداد ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ تیر ۱۴۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.292303.2569

مقدمه

افزایش تراکم آبزیان در واحد سطح در سیستم‌های متراکم و فوق متراکم آبزی‌پروری، مشکلاتی هم‌چون ضعف سیستم ایمنی و بروز بیماری‌های عفونی را به‌دنبال دارد که این مشکلات، توسعه این صنعت را با مشکل مواجه نموده است (Syahidah و همکاران، ۲۰۱۵). برای جلوگیری از مشکلات مذکور، هر ساله مقدار زیادی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد که علاوه بر آلوده‌سازی محیط زیست و با ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نهایت سلامت مصرف کننده را به خطر می‌اندازند (Lazado و همکاران، ۲۰۱۵). از طرف دیگر به‌کارگیری مواد محرک ایمنی در خلال دو دهه اخیر راه حل تغذیه‌ای مناسبی برای کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در آبزی‌پروری بوده است (Syahidah و همکاران، ۲۰۱۵). در میان محرک‌های ایمنی طبیعی، گیاهان دارویی به‌علت دسترسی آسان، قیمت ارزان و آسیب کم‌تر به محیط و آبزیان مورد توجه قرار گرفته‌اند (Yang و همکاران، ۲۰۲۰). این گیاهان علاوه بر تقویت سیستم ایمنی، موجب بهبود شاخص‌های رشد شده و سود آبزی‌پروری را افزایش می‌دهند (Elabdab و همکاران، ۲۰۱۶). علاوه براین، در آبزی‌پروری هزینه خوراک بیش‌ترین سهم هزینه‌ها را دارا است. بنابراین تهیه غذای کامل و ارزان قیمت می‌تواند نقش مهمی در کاهش هزینه‌های و تولید داشته باشد (Syahidah و همکاران، ۲۰۱۵). مواد گیاهی متعددی برای تعدیل و بهینه‌سازی فلور باکتریایی دستگاه گوارش آبزیان وجود دارد که نیاز به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در کنترل باکتری‌ها مرتفع می‌سازند. بدین‌ترتیب قابلیت هضم و جذب خوراک و بهبود عملکرد سیستم ایمنی، بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش می‌یابد. اما جستجو برای یافتن جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها، هنوز هم ادامه داشته و ضروری به‌نظر می‌رسد (Lazado و همکاران، ۲۰۱۵). یکی از این جایگزین‌ها ریشه گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) است. شیرین‌بیان، گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده باقلاییان (Fabaceae) است (Esmaeili و همکاران، ۲۰۲۰). این گیاه بومی نواحی مدیترانه، جنوب روسیه و آسیا بوده و در اکثر نقاط ایران به فراوانی می‌روید (Esmaeili و همکاران، ۲۰۲۰). ترکیبات فعال شیرین بیان شامل فلاونوئیدها، گلیسیریزیک اسید (گلیسیریزین)، گلابریدین، لیکوریتین و لیکوریتیژنین بوده که خواص ضدمیکروبی، ضدویروسی و ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها گزارش شده است (Xiaoying و همکاران، ۲۰۱۷). آثار مثبت گیاه شیرین بیان در بهبود شاخص‌های رشد و سیستم ایمنی ماهی سوف زرد (*Perca flavescens*) (Elabdab و همکاران، ۲۰۱۶)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Abdel-Tawwab و El-Araby، ۲۰۲۱) و باس آسیایی (*Lates calcarifer*) (Yang و همکاران، ۲۰۲۰) به‌اثبات رسیده‌است. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مهم‌ترین گونه ماهیان پرورشی سردآبی ایران است که مقدار تولید آن در سال ۱۳۹۶ حدود ۱۶۶ هزار تن بوده است (سالنامه شیلات ایران، ۱۳۹۷). با توجه به اهمیت توسعه صنعت پرورش متراکم ماهی در کشور، نیاز به استفاده از مواد گیاهی کاملاً طبیعی که بتوانند تولید را افزایش داده و سلامت آبزیان پرورشی را هم تامین نمایند کاملاً ملموس است. در این راستا و بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات متعدد درباره آثار مثبت شیرین بیان بر شاخص‌های ایمنی در گونه‌های مختلف آبزیان، تأثیر ریشه گیاه شیرین بیان در جیره بر شاخص‌های ایمنی موکوس و ارزیابی الگوی پروتئینی موکوس پوست بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در یک‌دوره ۸ هفته‌ای در تابستان سال ۱۳۹۹ در ایستگاه تحقیقاتی خجیر (تهران، ایران) انجام گرفت. به‌طوری‌که تعداد ۲۷۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۱۱±۹/۴۶ گرم ابتدا به‌مدت دو هفته با شرایط محیطی جدید سازگار شدند و در ادامه در ۱۵ مخزن پلاستیکی مربع شکل با گنجایش ۲۰۰ لیتر (هر مخزن شامل ۱۸ قطعه بچه‌ماهی) به‌صورت تصادفی توزیع شدند. فاکتورهای کیفی آب در طول دوره شامل اکسیژن، pH و دما به صورت روزانه به کمک دستگاه سنجش‌گر پرتابل کیفی آب TPS Pty Ltd ساخت کشور استرالیا (مدل TPS 90FL-T model, TPS Pty Ltd, Brisbane, Australia) اندازه‌گیری می‌شدند (جدول ۱). هم‌چنین، میزان نیتریت، آمونیوم و آمونیاک نیز به‌صورت هفتگی توسط دستگاه پرتابل HACH مدل DR-1900 ساخت کشور آلمان سنجش می‌شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمایی محیط پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف پودر عصاره شیرین بیان به‌مدت ۵۶ روز

پارامتر	مقدار
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	۱۵/۰±۴۱/۷۷
اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	۸/۰±۳۶/۵۳
pH	۷/۰±۸۱/۷۰
آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۰۲۸ ۰±/۰۰۳
نیتریت (میلی گرم در لیتر)	۰/۰۱ ۰±/۰۰۱

برای تهیه پودر ریشه شیرین‌بیان (*G. glabra*)، ریزوم گیاه مذکور از استان فارس به‌صورت تازه تهیه و به قطعات کوچک بریده، شسته

و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد. در ادامه ریزوم خشک شده گیاه توسط آسیاب آزمایشگاهی تبدیل به پودر شد. پودر حاصله از مش ۰/۰۱ میلی‌متر عبور داده شد و قسمت‌های چوبی باقی مانده بر روی الک، دوباره در آسیاب با دور شش هزار دور در دقیقه آسیاب گردید. در ادامه به پودر ریشه به نسبت ۵۰ برابر آب مقطر اضافه و به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از طی مدت زمان استخراج محتوی ظرف به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. نهایتاً عصاره با خشک‌کن انجمادی آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (Alpha 2-4 LSC, Martin Christ Co., Germany) طی ۲۴ ساعت لیوفیلیزه و خشک شد. عصاره خشک شده ابتدا آسیاب شده و تا زمان اضافه شدن به خوراک در دسیکاتور نگه‌داری شد (Ahangarpour و Oroojan، ۲۰۱۰). این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد که واجد ۵ تیمار و هر تیمار واجد ۳ تکرار بود. برای تهیه و آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی، مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد پودر خشک شیرین بیان به خوراک به اجزاء غذای پایه (جدول ۲) اضافه‌شد (Tawwab و El-Araby، ۲۰۲۱).

جدول ۲: ترکیبات جیره‌های آزمایشی جهت انجام مطالعه (برحسب درصد در ماده خشک)

ترکیب جیره	جیره‌های آزمایشی (پودر عصاره شیرین بیان)				
(گرم/کیلوگرم)	شاهد(۰)	۰/۵	۱	۲	۳
آرد ماهی کیلکا[1]	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵	۵۵
امپریال	۴	۴	۴	۴	۴
کنجاله سویا	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
آرد گندم	۱۰/۴	۱۰/۴	۱۰/۴	۱۰/۴	۱۰/۴
روغن ماهی	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
روغن کانولا	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
پرکننده (بنتونیت)	۱۰/۵	۱۰	۹/۵	۸/۵	۷/۵
پودر شیرین بیان	۰	۰/۵	۱	۲	۳
توکسین بایندر	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳
آنتی اکسیدان	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
متیونین	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
مخلوط ویتامینی[2]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مخلوط مواد معدنی[2]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
جمع کل (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

[1] آردماهی کیلکا (ماهیان خانواده شگ ماهیان دریای خزر، مجتمع آردماهی خزر، مازندران، ایران) دارای ۵۹/۸ درصد پروتئین خام، ۱۵/۱ درصد چربی و ۱۱/۵ درصد خاکستر، [2] مخلوط ویتامین‌ها و موادمعدنی از شرکت سیانس(تهران، ایران) تهیه شد.

برای حفظ فرمولاسیون خوراک، پودر عصاره شیرین بیان با پرکننده (فیلر) خوراک جایگزین گردید. خوراک آزمایشی پایه حاوی ۴۸٪ پروتئین، ۱۲٪ چربی، ۱۲٪ خاکستر و ۹٪ رطوبت در وزن خشک بود. بچه‌ماهیان بر حسب درصد وزن بدن و دمای آب در حد سیری (حدود ۲/۵ تا ۳٪ وزن زی‌توده) غذادهی شدند. یک هفته پس از سازگاری ماهی‌ها با کرت‌های آزمایشی (مخازن پلاستیکی) بخش اجرایی آزمایش آغاز گردید و به‌مدت ۵۶ روز ادامه یافت. در خلال این زمان، ماهی‌ها روزانه ۴ بار طی ساعات ۷:۰۰، ۱۲:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۱۸:۰۰ با جیره‌های آزمایشی تغذیه می‌شدند. عملیات غذادهی به‌صورت دستی انجام گرفت.

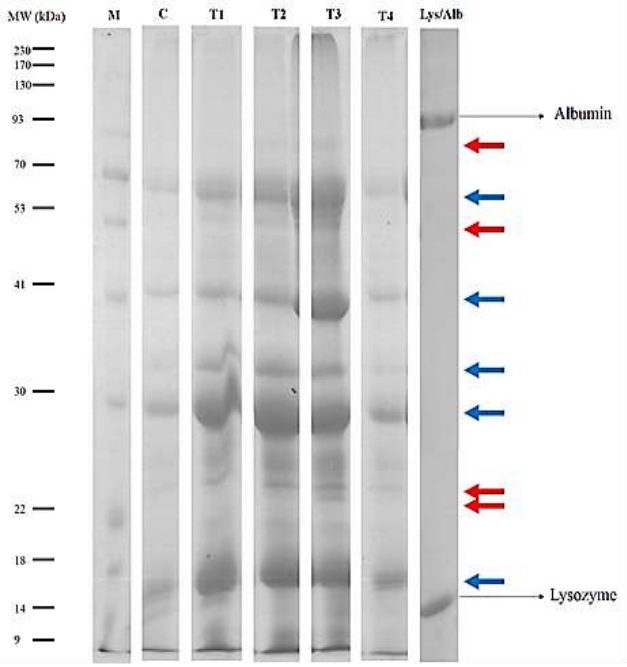
برای تهیه موکوس پوست ماهیان آزمایشی در پایان آزمایش (روز ۵۶)، از هر مخزن ۵ عدد ماهی به‌صورت تصادفی صید و پس از بی‌هوشی با اسانس گل میخک (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، به‌صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی اتیلنی زیپ‌دار حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفت. غذادهی به ماهی‌ها ۲۴ ساعت قبل از صید قطع شد. پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه‌ها خارج و به درون آب پر از اکسیژن منتقل شدند. موکوس جمع‌آوری شده در کیسه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (Eppendorf, Engelsdorf, Germany 5810 R) با دور g ۱۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس مایع سطحی جدا و به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگه‌داری شد (Ross و همکاران، ۲۰۰۰). در این بررسی برخی شاخص‌های ایمنی موکوس شامل آلکالین فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین تام و میزان پروتئین محلول کل در موکوس اندازه‌گیری گردید. برای تعیین میزان آلکالین فسفاتاز قلیایی از دستگاه اسپکتوفومتر و کیت آزمایشگاهی پارس آزمون طب استفاده شد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست به‌روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. هم‌چنین جهت اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین تام از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) طبق روش توضیح داده شده برای سرم استفاده گردید. بدین‌منظور ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر از کیت ترکیب شده و جذب نوری آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. ارزیابی الگوی پروتئینی SDS PAGE نیز براساس روش Laemmli (۱۹۷۰) انجام شد. نمونه‌های موکوس (۱۰ میلی‌گرم پروتئین خام) به نسبت ۱:۴ با بافر نمونه (۴٪ اس‌دی‌اس، ۵۰ میلی‌لیتر بر مول تریس اسیدکلریدریک، ۲٪ مرکاپتواتانول، ۱۲٪ گلیسرول و ۵٪ بروموفنول بلو) حل شده و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به‌مدت ۳ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شده و محلول صاف شده حاصل از سانتریفوژ، جهت الکتروفورز استفاده گردید. ۲۲ میکرولیتر از هر نمونه به همراه یک مارکر وزن مولکولی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۸٪ و ژل انباری ۵٪ (استکینگ ژل) قرار داده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ۱۲۰ ولت صورت گرفت و تا زمانی‌که مارکر بروموفنول بلو از استکینگ ژل عبور کند ادامه یافت. سپس ولتاژ به ۲۰۰ ولت افزایش یافته و الکتروفورز به‌مدت ۷ ساعت با بافر الکتروفورز ۵ ایکس ادامه داده شد. پس از اتمام الکتروفورز برای

مشخص کردن باندهای پروتئینی، ژل‌ها به‌وسیله ۰/۵٪ کوماسیبلو (۲۵۰ G) به‌مدت ۲ ساعت رنگ‌آمیزی گردیدند و سپس طی ۲ مرحله به وسیله محلول رنگ‌زدایی کوماسی بلو به‌مدت ۴ ساعت رنگ‌های مازاد حذف شدند. در این بررسی عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه اسکنر انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تمامی مراحل تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. در ابتدا همگنی واریانس داده‌ها به‌کمک آزمون لون(Leven Test)و نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگرف-اسمیرانف(Kalmogorov- Smiranov Test) مورد بررسی قرار گرفت. سپس آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way analysis of varianc) داده‌ها جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلافات معنی‌دار بین تیمارها درخصوص شاخص‌های مورد بررسی انجام گرفت. مقایسه میانگین شاخص‌های مورد بررسی در تیمارهای پنج‌گانه نیز با استفاده از آزمون مقایسه چنددامنه‌ای دانکن (Duncans Multiple-range test) در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت (P<۰/۰۵).

نتایج

در جدول ۳ تغییرات سطوح فاکتورهای موکوس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف پودر ریشه شیرین‌بیان آورده شده است. فعالیت لیزوزیم و میزان پروتئین تام موکوس پوست در گروه تغذیه شده با تیمارهای مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد) پودر شیرین بیان تفاوت معنی‌داری با هم داشتند و بالاترین مقدار در تیمار ۲ درصد شیرین بیان دیده شد (P<۰/۰۵). در این بررسی میزان ایمونوگلوبولین تام موکوس در تیمارهای واجد ۱ و ۲ درصد شیرین بیان، بیش از سایر تیمارها بود. هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار ۲ درصد به‌میزان ۴۲/۰۰±۰/۸۹ (IU/لیتر) در بالاترین سطح بود و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها به‌ویژه با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). فعالیت لیزویم موکوس در تیمارهای ۱ تا ۳ درصد بدون اختلاف معنی‌دار (P>۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۵ درصد بالاتر بود (P<۰/۰۵). ارزیابی الگوی پروتئینی موکوس پوست با استفاده از SDS-PAGE در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف پودر ریشه شیرین بیان در شکل ۱ نشان داده شده است.تفاوت قابل‌توجه‌ای بین واحدهای پروتئینی موکوس پوست در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌حاوی شیرین‌بیان و جیره شاهد مشاهده شد به‌نحوی‌که نوارهای پروتئینی در محدوده ۹-۱۳۰ کیلودالتونی بودند.نتایج نشان داد شدت باندهای پروتئینی در محدوده ۷۰، ۴۱، ۳۰، و ۱۸ کیلودالتون در ماهیان تغذیه شده با شیرین‌بیان تا ۲ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (پیکان‌های آبی). درحالی‌که غلظت این باندهای پروتئینی در تیمار تغذیه شده با ۳ درصد شیرین بیان کاهش یافت. علاوه‌براین، با افزایش مقدار شیرین بیان تا ۳ درصد، گروهای جدید پروتئینی دیده شدند (پیکان‌های قرمز). شدت باندهای لیزوزیم با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلودالتون در تیمارهای واجد شیرین بیان، افزایشی بود به‌نحوی‌که بیش‌ترین شدت باند در تیمار واجد ۲ درصد شیرین بیان مشاهده شد.



شکل ۱: الگوی پروتئینی موکوس پوست بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط روش SDS-PAGE. فلش‌های آبی نوارهایی با شدت افزایش یافته را نشان می‌دهد. فلش‌های قرمز نشان‌دهنده باندهای جدید است. خط M: مارکر یا لدر. خط C: گروه شاهد، خطوط T1 تا T4: به‌ترتیب ماهیان تغذیه شده به‌ترتیب با ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد پودر عصاره ریشه شیرین بیان، خط Lys/Alb: لیزوزیم و آلبومین

جدول ۲: تغییرات سطوح شاخص‌های ایمنی موکوس ماهیان تغذیه شده با مقادیر مختلف پودر ریشه شیرین بیان

شاخص	شاهد	شیرین بیان (۰/۵ درصد)	شیرین بیان (۱ درصد)	شیرین بیان(۲ درصد)	شیرین بیان (۳ درصد)
پروتئین تام (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	۲/۴۳±۰/۲۰d	۳/۱۳±۰/۱۵c	۳/۷±۰/۰۴b	۴/۸۷±۰/۱۹a	۳/۵۶±۰/۱۶b
ایمونوگلوبولین تام (U/ لیتر)	۲/۶۶±۰/۲۱c	۲/۸۳±۰/۱۶c	۴/۶۷±۰/۱۵a	۴/۸۹±۰/۲۴a	۳/۳۸±۰/۲۷b
فعالیت لیزوزیم (U/میلی‌لیتر/دقیقه)	۱۲/۳±۰/۲۶c	۱۳/۲۲±۰/۲۰b	۱۵/۶۶±۰/۴۰a	۱۵/۹۴±۰/۵۱a	۱۶/۰۳±۰/۱۳a
فعالیت آلکالین فسفاتاز (U/ لیتر)	۳۰/۳±۰/۲۴d	۳۴/۳±۱/۰۳c	۳۸/۲۱±۱/۴۵b	۴۲/۰۰±۰/۸۹a	۳۹/۷۶±۱/۰۵b

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

نقش محافظتی موکوس پوست ماهی به‌عنوان اولین خط دفاعی بر علیه پاتوژن‌ها روشن است. موکوس به‌طور دائمی از لایه‌های سطحی بدن ماهی ترشح می‌گردد که علاوه بر نقش محافظتی، در جلوگیری از اتصال عوامل پاتوژن به اپی‌تلیوم پوست نیز نقش مهمی ایفا می‌نماید (Cone، ۲۰۰۹). موکوس حاوی مواد گوناگونی هم‌چون لیزوزیم، فسفاتازهای قلیایی و اسیدی، لکتین‌ها و ایمونوگلوبولین می‌باشد که خاصیت آنتی میکروبی داشته و نقش اساسی در سیستم دفاعی ماهی به‌عهده دارند (Jung و همکاران، ۲۰۱۲). لیزوزیم از مهم‌ترین اجزای سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود که موجب تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری در ماهی می‌گردد. فعالیت باکتری‌کشی لیزوزیم در موکوس پوست ماهی و سایر بافت‌ها یکی از مکانیسم‌های مهم دفاعی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا تلقی می‌گردد. تفاوت چشمگیری در سطوح آنزیم لیزوزیم در موکوس پوست ماهی‌های مختلف وجود دارد که این تفاوت وابسته به گونه ماهی مورد مطالعه، جیره غذایی و هم‌چنین شرایط محیط پرورشی است (Ellis، ۱۹۹۰). در مطالعه حاضر، فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبولین تام و میزان پروتئین موکوس پوست در گروه‌های تغذیه شده با تیمارهای واجد ۱، ۲ و ۳ درصد شیرین بیان نسبت به گروه شاهد و ۱ درصد به‌طور معنی‌داری بهبود یافته بودند. روند تولید ایمونوگلوبولین‌ها در ماهی وقوع مجموعه‌ای از واکنش‌های بین‌سلولی میان لنفوسیت‌ها و اینترلوکین‌ها در پاسخ به آنتی‌ژن میکروارگانیسم مهاجم می‌باشد (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). درحقیقت ایمونوگلوبولین‌ها پروتئین‌های مهمی هستند که در غیاب محرک‌های آنتی‌ژنی خارجی نیز به‌طور کاملاً حساب شده تولید و جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی به‌شمار می‌آیند و به جهت محافظت سریع در برابر عوامل بیماری‌زا به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیان محسوب می‌گردند (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). در این پژوهش، میزان ایمونوگلوبولین تام موکوس در تیمارهای واجد ۱ و ۲ درصد شیرین بیان بیش‌تر از سایر تیمارها بود. آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیم‌هایی است که به‌وسیله سلول‌های جـداره روده و برخی از بافت‌ها ترشح می‌گردد و نقش آن در موکوس، حفاظت از پوست در برابر عوامل پاتوژن است (Sheikhzadeh و همکاران، ۲۰۱۱). آنزیم فسفاتاز قلیایی به‌دلیل فعالیت هیدرولیتیکی به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی ضروری شناخته شده و در بهبود زخم، عفونت‌های انگلی و استرس‌ها در ماهی نقش دارد (Iger و Abraham، ۱۹۹۰). در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار واجد ۲ درصد شیرین بیان به‌میزان ۰/۸۹±۴۲/۰۰ (IU/ لیتر) و در بالاترین میزان خود قرار داشت. نتایج مطالعه Xu و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که علت بهبود و افزایش پاسخ ایمنی موکوس در ماهی سوف زرد افزایش سطح IGM موکوس، ناشی از حضور شیرین بیان در جیره بوده است. در مطالعه بر روی گیاهان دیگر نیز نتایج مشابهی گزارش شده است به‌طوری‌که در بررسی Adel و همکاران (۲۰۲۰) استفاده از سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه هفت بند نازک (*Polygonum minus*) موجب افزایش معنی‌دار سطوح پروتئین تام موکوس، آنزیم آلکالین‌فسفاتاز، لیزوزیم و استراز موکوس پوست‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با تیمار شاهد گردید. هم‌چنین نتایج بررسی Adel و همکاران (۲۰۱۵) نشان‌داد که حضور گیاه‌نعناع فلفلی در جیره (سطوح ۲ و ۳ درصد) منجر به افزایش ایمنی موکوسی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) می‌گردد به‌طوری‌که میزان پروتئین محلول موکوس و فعالیت لیزوزیم آن افزایش قابل توجهی را در تیمارهای مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد نشان داد. نتایج مطالعه Salmanian Ghehdarijani و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد که در انتهای دوره ۸ هفته‌ای تغذیه ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) با تیمارهای حاوی پودر سیر (۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم) افزایش قابل توجهی در میزان آلکالین فسفاتاز و سطوح پروتئین محلول موکوس پوست نسبت به تیمار شاهد رخ داد. آزمون SDS-PAGE در مطالعات متعددی برای شناسایی تفاوت الگوی پروتئینی موکوس بسیاری از گونه‌های ماهی استفاده شده است (Kami kouchi و همکاران، ۲۰۰۴). ارزیابی الگوی پروتئینی موکوس پوست در بچه‌ماهیان آزمایش حاضر، حاکی از افزایش شدت باندهای پروتئینی در محدوده ۷۰، ۴۱، ۳۰، و ۱۸ کیلو دالتون در تیمارهای واجد مکمل شیرین بیان بود. اما این وضعیت در گروه شاهد مشاهده نگردید. غلظت باندهای پروتئینی در گروه تغذیه شده با تیمار واجد ۳ درصد شیرین بیان کاهش یافت اما در همین تیمار (۳ درصد شیرین بیان)، گروهای پروتئینی جدیدی مشاهده گردید که در سایر تیمارها دیده نشدند. لیزوزیم با وزن مولکولی تقریبی ۱۸ کیلودالتون، بیش‌ترین شدت باند را در گروه تغذیه شده با خوراک واجد ۲ گرم شیرین بیان در کیلوگرم نشان داد که این شدت از گروه شاهد و گروه‌های تغذیه شده با ۰/۵ و ۱ درصد شیرین بیان بهتر بود. در بررسی هم‌سو، واحدی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند که تغییر شاخص الگوی پروتئینی موکوس ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه‌شده با سطح ۱ درصدعصاره آبی-الکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) نسبت به سطح ۰/۵ درصد و ۲ درصد بیش‌ترین ضخامت باند را داشته است. براساس مطالعه Najafian و Babji (۲۰۱۲) پپتیدهای آنتی باکتریال، کم‌تر از ۲۱ آمینواسید داشته و وزن مولکولی آن‌ها کم‌تر از ۴۱ کیلودالتون است. لذا احتمال می‌رود افزایش محسوس تراکم باندهای دارای وزن مولکولی کم‌تر از ۴۱ کیلو دالتون نیز سبب بهبود سیستم ایمنی غیراکتسابی گردد. در مجموع، به‌نظر می‌رسد که استفاده از شیرین بیان به‌ویژه به‌میزان ۲ درصد در

خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آثار مثبتی برشاخص‌های ایمنی و الگوی پروتئینی‌موکوس پوست به‌عنوان اولین‌سدسیستم‌دفاعی داشته باشد. هر چند که انجام مطالعات تکمیلی جهت بررسی تأثیر این گیاه بر شاخص‌های رشد و ایمنی، فعالیت و عملکرد آنزیم‌های گوارشی و آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات‌شیمیایی بدن و هم‌چنین میزان‌مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا نیز ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از تلاش‌ها و زحمات پرسنل‌مجتمع آزمایشگاهی‌دانشگاه آزاداسلامی‌واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱. **سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۷.** سالنامه آماری سازمان شیلات ایران (۱۳۹۱-۱۳۹۶). دفتر برنامه‌ریزی و بودجه، معاونت برنامه‌ریزی و مدیریت منابع، سازمان شیلات ایران. ۶۴ صفحه.

۲. **واحدی، ف.؛ صفری، ر.؛ شعبانی، ع.؛ حسینی‌فر، ح. و نژاد مقدم، ش.، ۱۳۹۶.** اثرات عصاره هیدروالکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره بر شاخص‌های ایمنی موکوس در ماهی گورخری (*Danio rerio*). محیط زیست جانوری. دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۱۸۳ تا ۱۹۰.

3. **Abdel-Tawwab, M. and El-Araby, D.A., 2021.** Immune and antioxidative effects of dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) on performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. Vol. 530, pp: 735-828.

4. **Adel, M.; Abedian Amiri, A.; Zorriehzahra, J.; Nematolahi, A. and Esteban, M.Á., 2015.** Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). Fish Shell Immunol. Vol. 45, pp: 841-847.

5. **Adel, M.; Dawood, M.A.; Shafiei, S.; Sakhaie, F. and Shekarabi, S.P.H., 2020.** Dietary Polygonum minus extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 519, pp: 734-738.

6. **Ahangarpour A. and Oroojan A.A., 2010.** The effects of Cassia italica leaves aqueous extract on non-pregnant uterus contraction in rats. Iran J Reprod Med. Vol. 4, pp: 179-184.

7. **Elabd, H.; Wang, H.P.; Shaheen, A.; Yao, H. and Abbass, A., 2016.** Feeding *Glycyrrhiza glabra* (liquorice) and *Astragalus membranaceus* (AM) alters innate immune and physiological responses in yellow perch (*Perca flavescens*). Fish Shell Immunol. Vol. 54, pp: 374-384.

8. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assay, Techniques in Fish Immunology. 3th ed. Fair Haven, USA. 103 P.

9. **Esmaeili, H.; Karami, A.; Hadian, J.; Ebrahimi, S.N. and Otto, L.G., 2020.** Genetic structure and variation in Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) populations based on morphological, phytochemical and simple sequence repeats markers. Ind Crop Prod. Vol. 145, pp: 112-140.

10. **Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of Lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish Shell Immunol. Vol. 42, pp: 533-538.

11. **Iger, Y. and Abraham, M., 1990.** The process of skin healing in experimentally wounded carp. J Fish Biol. Vol. 22, No. 3, pp: 124-132.

12. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish. 114 p.

13. **Jung, T.S.; del Castillo, C.S.; Javaregowda, P.K.; Dalvi, R.S.; Nho, S.W.; Park, S.B. and Aoki, T., 2012.** Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Dev Comp Immunol. Vol. 38, No. 2, pp: 295-301.

14. **Kamikouchi, A.; Morioka, M. and Kubo, T., 2004.** Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. Zoolog Sci. Vol. 24, No. 1, pp: 22-23.

15. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T1. Nat J. Vol. 227, No. 5259, pp: 680-685.

16. **Lazado, C.C.; Caipang, C.M.A. and Estante, E.G., 2015.** Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. Fish Shell Immunol. Vol. 45, pp: 2-12.

17. **Najafian, L. and Babji, A.S., 2012.** A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. Peptid. Vol. 22, No.1, pp: 428-482.

18. **Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Jojnson, S.C., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. Dis Aquat Organ. Vol. 41, No.1, pp: 43-51.

19. **Salmanian Ghehdarijani, M.; Hajimoradloo, A.; Ghorbani, R. and Roohi, Z., 2016.** The effects of garlic supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish Shell Immunol. Vol. 49, pp: 79-83.

20. **Sheikhzadeh, N.; Nofouzi, K.; Delazar, A. and Khani Oushani, A., 2011.** Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shell Immunol. Vol. 31, pp: 1268-1269.

21. **Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993**. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. In: Disease diagnosis and prevention methods. IFI Olsztyn, Poland. 112 p.

22. **Syahidah, A.; Saad, C.R.; Daud, H.M. and Abdelhadi, Y.M., 2015.** Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iran J Fish Sci. Vol. 14, No. 1, pp: 27-44.

23. **Xiaoying, W.; Han, Z. and Yu, W., 2017.** *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): ethnobotany and health benefits. In: Sustained energy for enhanced human functions and activity. Academic Press. 250 p.

24. **Xu, J.; Zhang, X.; Luo, Y.; Wan, X.; Yao, Y.; Zhang, L. and Xu, Z., 2019.** IgM and IgD heavy chains of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Molecular cloning, characterization and expression analysis in response to bacterial infection. Fish Shell Immunol. Vol. 84, pp: 233-243.

25. **Yang, R.; Han, M.; Fu, Z.; Wang, Y.; Zhao, W.; Yu, G. and Ma, Z., 2020.** Immune Responses of Asian Seabass *Lates calcarifer* to Dietary *Glycyrrhiza uralensis*. Anim. Vol. 10, pp: 629.