(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

تأثیر آلژینات سدیم بر تحریک شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و مقاومت به سمیت ناشی از ازن در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **سمیرا سالاروند**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
- **سیدامیرحسین جلالی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

: پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

- **نصرا... محبوبی‌صوفیانی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
- **علیرضا علافچیان**: پژوهشکده نانومواد و مواد پیشرفته، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٨

چکیده

آلژینات سدیم، پلی‌ساکاریدی آنیونی است که امروزه به‌دلیل خواص تحریک ایمنی و رشد به‌عنوان یک پربیوتیک نوین مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه تأثیر آلژینات سدیم بر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و عملکرد رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. بدین‌منظور ۹۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد با میانگین وزنی ۳/۰±۳ گرم با جیره حاوی ۲/۵ گرم بر کیلوگرم آلژینات سدیم به میزان ۳ درصد وزنی به‌مدت ٤٥ روز تغذیه شدند. در روزهای ١٥ و ٤٥ بررسی شاخص‌های رشد و ایمنی غیراختصاصی، مسیر فرعی کمپلمان (ACH50)، فعالیت باکتری‌کشی سرم و فعالیت انفجار تنفسی انجام شد. در پایان دوره تیمارها با دوز سمی ازن مواجه شدند. نتایج نشان داد ماهی‌های تغذیه شده با جیره حاوی آلژینات سدیم در شاخص‌های درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و فاکتور وضعیت به استثنا وزن نهایی (P<۰/۰٥) در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند (P>۰/۰٥). در هر دو بررسی ١٥ و ٤٥ روز، عملکرد مثبت آلژینات سدیم در افزایش معنی‌دار شاخص‌های لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان، فعالیت انفجار تنفسی و فعالیت باکتری‌کشی سرم در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰٥). هم‌چنین در زمان مواجهه با دوز سمی ازن، آلژینات سدیم موجب افزایش درصد زنده‌مانی نسبی در مقایسه با تیمار شاهد گردید. نتایج نشان داد، استفاده از آلژینات سدیم در جیره باعث بهبود عملکرد و تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهی‌ها در مواجهه با مقادیر سمی ازن و در نهایت افزایش درصد زنده‌مانی نسبی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد گردید.

کلمات کلیدی: پربیوتیک، آلژینات سدیم ، قزل‌آلای رنگین کمان، سیستم ایمنی غیراختصاصی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sahjalali@cc.iut.ac.ir

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

مقدمه

جمعیت رو به رشد جهان، دغدغه تأمین و کمبود مواد غذایی به‌خصوص منابع پروتئینی، سبب شده تا در دهه‌های اخیر به منابع خوراکی با منشأ آبزیان توجه خاصی شود. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دلیل ویژگی‌های خاصی ازجمله سازش با طیف وسیعی از شرایط محیطی و امکان پرورش متراکم، به‌عنوان یکی از گونه‌های با ارزش تجاری بالا مورد توجه است. با این وجود همواره مشکلاتی از قبیل تراکم زیاد و استرس ناشی از آن در کنار دیگر تنش‌های محیطی به ویژه در مرحله حساس بچه‌ماهی پیش‌روی پرورش این گونه وجود دارد. ضعیف شدن سیستم ایمنی توسط تنش‌های محیطی می‌تواند منجر به مستعد شدن ماهی‌ها برای ابتلا به بیماری‌ها شود، که تولید اقتصادی سیستم‌های آبزی‌پروری را محدودمی‌کند (Sado و همکاران، ۲۰۰۸). به‌دلیل حساسیت ماهی‌ها در وزن‌های پایین، کیفیت و نحوه شرایط پرورش آن‌ها در این مراحل، می‌تواند رونق تولید یا شکست برنامه‌های پرورش را تحت تأثیر قرار دهد. به‌طورکلی لازمه افزایش تولید با کیفیت، تولید بچه‌ماهی سالم و مقاوم است. به‌عبارت دیگر تقویت سیستم ایمنی از ابتدای مراحل زندگی ماهی منجر به مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و افزایش زنده‌مانی و درنهایت افزایش تولید در مراحل بعد می‌شود. از طرفی با پیشرفت سیستم‌های پرورش ماهی به‌منظور تولید بیش‌تر و استفاده از روش‌هایی مانند استفاده از ازن برای تصفیه آب و حذف پاتوژن‌ها خصوصاً در سیستم‌های مدار بسته، احتمال ورود مقادیر ناچیز ازن در آب برگشتی این سیستم‌ها وجود داردو ازن می‌تواندحتی‌در مقادیر کم به‌عنوان یک‌عامل شیمیایی مضر و استرس‌زای محیطی باعث آسیب به ماهی شود (Langlais و همکاران، ۱۹۹۱). بنابراین راهکارهایی ازجمله تقویت سیستم ایمنی ماهی با استفاده از انواع مکمل‌ها و افزودنی‌های خوراکی می‌تواند بسیار موثر باشد. به‌همین منظور برای بهبود سلامت و جلوگیری از مرگ و میر و کاهش تولید در پرورش ماهی از افزودنی‌های خوراکی محرک ایمنی و رشد به‌عنوان روش‌های‌نوین،استفاده می‌شود. استفاده از مواد محرک سیستم ایمنی در پرورش ماهی به‌منظور افزایش توان سیستم ایمنی و پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و حفظ بدن در برابر بیماری‌ها عمومیت یافته است (Kapetanovic و همکاران، ۲۰۰۵). پربیوتیک‌ها ترکیبات غیرقابل هضم و قابل تخمیر هستند که باعث رشد یا تغییر فعالیت باکتریایی روده به سمت باکتری‌های مفید روده یا پروبیوتیک‌ها و در نهایت تحریک پاسخ ایمنی، افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا و بهبود عملکرد رشد در انسان و حیوانات به‌خصوص گونه‌های حیوانی پرورشی می‌شوند. این ترکیبات در آبزی‌پروری نیز برای تغذیه گونه‌های مختلف ماهی و میگو در راستای تسریع رشد، تحریک پاسخ ایمنی و کنترل بیماری‌ها استفاده می‌شوند (Salze و همکاران، ۲۰۰۸). ازجمله این ترکیبات می‌توان به آلژینات سدیم اشاره کرد که یک پلی‌ساکارید خطی و آنیونی و مشتق از جلبک‌های قهوه‌ای از جمله *Laminaria digitata* و باکتری‌های خاک ازجمله *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد (Aguero و همکاران، ۲۰۱۷). آلژینات‌متشکل‌ازدونوع‌واحدمونوساکاریدی‌به اسم α-l- گالاکتورونیک و β-D- مانورونیک اسید می‌باشد. ازجمله خواص آلژینات می‌توان به سازگاری زیستی، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد (Kelishomi و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین طی سال‌های اخیر تحقیقات متعدد صورت گرفته در زمینه آبزیان اثرات محرک ایمنی و رشد آلژینات سدیم را اثبات کرده است. در مطالعه‌ای آلژینات سدیم برای تزریق داخل صفاقی به‌منظور افزایش ایمنی و مقاومت در ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* استفاده شد که نتایج نشان داد، شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و مقاومت نسبت به *Vibrio alginolyticus*، در تیمارهای آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت (Cheng و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین آلژینات سدیم برای بررسی توانایی سیستم ایمنی میگوی سفید غربی *Litopenaeus vannamei* و مقاومت در مقابل باکتری *Vibrio alginolyticus*، مورد استفاده قرار گرفت (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵). درمطالعه دیگری تأثیر جیره حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم (LMWSA= low molecular weight sodium alginate)، بر ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد استفاده از جیره‌های حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم، می‌تواند عملکرد رشد و ایمنی غیراختصاصی را تحریک و باعث افزایش مقاومت ماهی شود (Van Doan و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به اهمیت تقویت سیستم ایمنی ماهی‌ها به‌ویژه در سنین کم و ایجاد مقاومت در مقابل عوامل استرس‌زا و بیماری‌ها و از طرفی اثرات مثبت و اثبات شده آلژینات سدیم در این زمینه، در مطالعه حاضر به استفاده از آلژینات سدیم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد و ارزیابی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و عملکرد رشد و در نهایت بررسی زنده‌مانی ماهی‌ها در مواجهه با دوز سمی ازن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و روش تحقیق: کلیه فرآیندهای این تحقیق در آزمایشگاه‌های تخصصی پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی و گروه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان به‌مدت ۶ هفته انجام شد. تعداد ۹۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۳±۰/۳ گرم بعد از انجام انواع تست‌های انگلی، قارچی، ویروسی و باکتریایی و کسب اطمینان از سلامت و عاری بودن از عوامل بیماری‌زا، به آزمایشگاه منتقل شدند. ماهی‌ها پس از اجرای دستورالعمل

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

ضدعفونی و قرنطینه آزمایشگاه، به‌مدت دو هفته با استفاده از جیره غذای آغازین تجاری قزل‌آلا (SFT2= Starter Feed Trout 2) به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه تغذیه شدند. پس از آن به‌صورت ۲ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار با ۱۵ ماهی) و به‌میزان ۳ درصد وزنی، در سه وعده غذا دهی شدند.

طرح آزمایش: در این مطالعه از مخازنی با حجم ۱۲ لیتر به عنوان واحد آزمایش استفاده شد. آب درون مخازن به‌طور دائم در گردش و تعویض بود. آب برگشتی با کمک دستگاه ازن و اشعه ماوراء بنفش (UV) ضدعفونی و پس از ۴۵ دقیقه نگه‌داری در مخزن ذخیره هزار لیتری، مجدد به مخازن ۱۲ لیتری حاوی ماهی منتقل شد. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب به‌طور روزانه و هفتگی ثبت گردید. به این صورت که در طول دوره آزمایش اکسیژن محلول ۸-۷ میلی‌گرم در لیتر، دمای آب ۱۴-۱۳ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۵-۸ ثبت شد.

تهیه جیره غذایی: به‌منظور آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی، غذای آغازین تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌صورت گرانول و با درصد اجزای غذایی مورد نیاز قزل‌آلا شامل (۵۰- ۴۶ درصد پروتئین خام، ۱۱-۱۵ درصد چربی خام، ۳-۱/۵ درصد فیبر خام، ۱۳-۹ درصد خاکستر، ۵-۱۱ درصد رطوبت و ۱/۵-۱ درصد فسفر) ولی بدون روغن از شرکت فرادانه تهیه شد. برای تهیه تیمار آزمایشی آلژینات سدیم (Sigma, Germany) به‌میزان ۲/۵ گرم درکیلوگرم غذا در آب حل و به‌وسیله اسپری روی سطح غذا پخش شد. بعد از ۲۴ ساعت خشک شدن در آون با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، روغن ماهی تهیه شده از شرکت فرادانه، به‌منظور پوشاندن و جلوگیری از هدر رفت آلژینات و اطمینان از رسیدن آن به ماهی به‌میزان ۷ میلی‌لیتر به‌ازای هر ۱۰۰ گرم خوراک به‌طور کامل روی سطح غذا اسپری شد(زارع‌حقیقی و همکاران، ۱۳۹۵). خوراک تهیه‌شده بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

فاکتورهای رشد: به‌منظور بررسی چگونگی رشد ماهیان در تیمارهای آزمایشی در پایان دوره بعد از ۲۴ ساعت عدم غذادهی به ماهی‌ها و اطمینان از تخلیه مجاری گوارشی، شاخص‌های رشد شامل وزن به‌دست آمده، درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و فاکتور وضعیت براساس روابط زیر محاسبه گردید (Ashuori و همکاران، ۲۰۱۸):

میانگین وزن اولیه (گرم) - میانگین وزن نهایی (گرم) = وزن به‌دست آمده (WG = Weight Gain)

میزان کل غذای خشک مصرفی (گرم) (FI = Feed intake)

۱۰۰ × [وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)/ وزن اولیه (گرم)] = درصد افزایش وزن بدن (BWG = Body Weight gain)

افزایش وزن (گرم) / میزان غذای مصرف شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی (FCR= Feed Conversion Ratio)

۱۰۰× [طول دوره آزمایش (روز) / (گرم) لگاریتم طبیعی وزن اولیه– لگاریتم طبیعی وزن نهایی (گرم)] = ضریب رشد ویژه (SGR= Specific growth ratio)

۱۰۰ × [طول کل (سانتی‌متر)/ وزن کل (گرم)] = فاکتور وضعیت (CF= Condition factor)

فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی: در روزهای ۱۵ و ۴۵ به منظور ارزیابی فاکتورهای ایمنی، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین غذادهی، ماهی‌ها به‌وسیله محلول گل میخک ۲۰۰ ppm بی‌هوش شده، سپس با استفاده از سرنگ (G۲۷) از ورید ساقه دمی خونگیری انجام شد. سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (به‌مدت ۱۰ دقیقه، دور ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) توسط سمپلر از لخته جدا شد و در میکروتیوپ‌های استریل جداگانه قرار گرفت.

بررسی فعالیت لیزوزیم: بررسی فعالیت لیزوزیم سرم خون ماهی، مطابق روش Ellis (۱۹۹۰) و براساس لیز باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* انجام شد. بدین منظور محلول ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری با افزودن ۳۰ میلی‌گرم از پودر باکتری (Sigma, St. Louis, MO, USA) به ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH ۶/۲ تهیه شد. در ادامه جحم ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم و ۱۳۰ میکرولیتر محلول ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری به ۱۰ میکرولیتر از سرم خون ماهی اضافه و جذب نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر، هر ۵ دقیقه یک‌بار و به‌مدت ۱ ساعت قرائت شد.

بررسی مسیر فرعی کمپلمان (ACH50): بررسی فعالیت مسیر فرعی کمپلمان براساس روش Milla و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت. سرم خون ماهی، توسط بافر ژلاتین ورونال، ۱۰ بار رقیق شد. مخلوط ۳ درصد گلبول‌های قرمز خون خرگوش به رقت‌های تهیه شده از سرم ماهی اضافه و پس ازانکوبه‌گذاری به‌مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۵ دقیقه بادور rpm ۱۸۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی توسط سمپلر جدا و جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید.

فعالیت انفجار تنفسی خون: برای ارزیابی احیاء نوتروفیل‌ها، مقدار ۵ میکرولیتر از خون هپارینه با ۲۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی مخلوط سپس با ۲۵ میکرولیتر محلول ۰/۲ درصد NBT ورتکس شد. پنج میکرولیتر محلول Tiriton به محلول قبلی اضافه گردید و مجدد ورتکس شد. محلول حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه‌داری شد (تا رنگ آن تیره شود). بعد از آن، مجدداً ورتکس شد.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول را برداشته و ۲۵ میکرولیتر DMF (N, N-dimethyl formamide)(Louis, MO, USA S igma, St.) اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه تخت منتقل و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با کمک دستگاه الایزا خوانده شد (Secombes، ۱۹۹۰).

بررسی فعالیت باکتری‌کشی سرم: ارزیابی فعالیت باکتری‌کشی سرم، براساس روش Kajita و همکاران (۱۹۹۰) عمل شد که برای این منظور باکتری *Aeromonas hydrophila*، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع (TSB= Tryptic Soy Broth) کشت شد. باکتری به‌مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰ g در بافر فسفات نمکی (Phosphate Buffer Solution=PBS)، با pH ۷/۴، ۳ مرحله تا حذف کامل TSB، شست و شو داده شد. غلظت سوسپانسیون باکتری به میزان ۱×۱۰^{۸} CFU تنظیم و به نسبت ۱: ۱ با سرم مخلوط و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت TSA (Tryptic Soy Agar) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شد. بعد از ۲۴ ساعت رشد، تعداد کلنی‌ها شمارش و پس از پردازش در فرمول زیر، فعالیت باکتری‌کشی گروه‌ها براساس درصد بیان شد.

=درصد فعالیت باکتری‌کشی

۱۰۰× (تعداد کلنی تیمار کنترل / تعداد کلنی تیمار آزمایشی)-۱

مواجهه با دوز سمی ازن: ازن در مقادیر بسیار کم برای ماهی مضر است و حداکثر میزان قابل تحمل برای ماهیان خانواده سالمونیده ۰/۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر است (Langlais و همکاران، ۱۹۹۱) و مقادیر بیش‌تر باعث آسیب حاد به بافت آبشش می‌شود که در نهایت بر اثر عدم تعادل فیزیولوژیک منجر به مرگ ماهی می‌شود (Bullock و همکاران، ۱۹۹۷). یک روز بعد از آخرین نمونه‌گیری تیمارها با آب حاوی مقادیر سمی ازن ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر (کاهش زمان ماندگاری آب ضدعفونی شده با ازن در مخزن ازن‌گیری از ۴۵ دقیقه به ۱۰ دقیقه قبل از توزیع در مخازن‌های حاوی ماهی) به‌مدت ۵ ساعت مواجه شدند. سپس میزان زنده‌مانی نسبی (RPS= Relative Percent Survival) ده روز پس از مواجهه با ازن با فرمول ذیل محاسبه شد:

= (RPS) درصد زنده‌مانی نسبی

[۱۰۰×(مرگ و میر گروه شاهد/مرگ و میر گروه آلژینات سدیم)] – ۱

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق با ۲ تیمار، ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف بررسی و تعیین شد. در صورت نرمال بودن، جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون T-Test با سطح معنی‌داری ۹۵ درصد، برای تیمارها استفاده شد. تمامی آنالیزها توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و نیز ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) انجام گرفت.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد بچه ماهی‌های تغذیه شده با آلژینات سدیم در مدت ۴۵ روز نشان می‌دهد که آلژینات سدیم موجود در جیره ماهیان بر افزایش وزن نهایی ماهی‌ها (WG) موثر و در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار ایجاد نمود ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین با وجود این که آلژینات سدیم در افزایش شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی (FCR)، ضریب رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن بدن (BWG) و فاکتور وضعیت (CF)، موثر بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱: شاخص‌های رشد (میانگین±خطای استاندارد) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص‌ها	تیمارها	
	شاهد	آلژینات سدیم
وزن اولیه (گرم)	۳/۸۵±۰/۱۷ a	۳/۹۱±۰/۰۴ a
وزن نهایی (گرم)	۱۰/۷۳±۰/۳۸ b	۱۲/۹۲±۰/۱۴ a
غذای مصرفی (گرم)	۵۵/۱۶ ±۱۵/۶۳ a	۵۷/۲±۳/۸۱ a
افزایش وزن بدن (٪)	۱۷۹/۸۶±۲۲/۸۳ a	۲۳۰/۵۷±۷/۹۸ a
ضریب تبدیل غذایی	۱/۲۰±۰/۱۲ a	۱/۰۶±۰/۱۴ a
نرخ رشد ویژه (٪)	۲/۲۷±۰/۱۸ a	۲/۶۵±۰/۰۵ a
فاکتور وضعیت	۰/۹۱±۰/۰۶ a	۰/۹۳±۰/۰۱ a

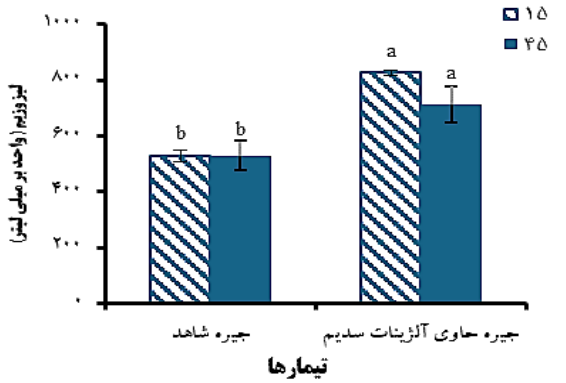
وجود حرف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است ($P>۰/۰۵$).

شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی: نتایج حاصل از بررسی‌های ایمنی‌شناسی در دو دوره ۱۵ و ۴۵ روز، در ماهی‌های مورد مطالعه مبین بهبود و افزایش سطح شاخص‌های ایمنی در طول مدت مطالعه بود. نتایج بررسی شاخص لیزوزیم نشان‌داد در روز ۱۵، تیمار آلژینات سدیم دارای بیش‌ترین مقدار لیزوزیم (۱/۱۱±۸۲۶/۷۶ واحد بر میلی‌لیتر)، در مقایسه با تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). در بررسی روز ۴۵، تیمار آلژینات سدیم با میزان لیزوزیم ۶۴/۰۸±۷۱۴/۷۱ واحد بر میلی‌لیتر، با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). با این‌حال مقایسه زمانی هر دو گروه نشان داد که لیزوزیم در تیمار شاهد در هر دو بررسی دارای ثبات و در تیمار آلژینات سدیم کاهش داشت ($P>۰/۰۵$).

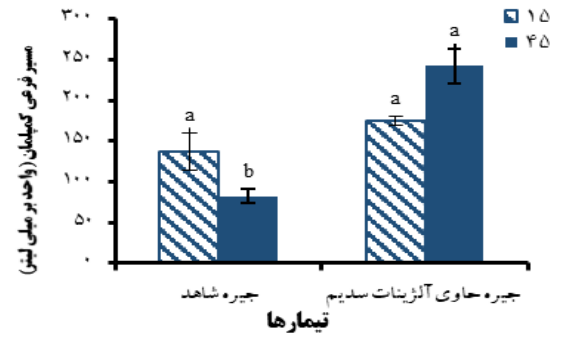
بررسی روز ۱۵ مسیر فرعی کمپلمان نشان داد که بیش‌ترین فعالیت مربوط به ماهی‌های تغذیه شده با آلژینات سدیم با میزان ۵/۹۷±۱۷۵/۲۹ واحد بر میلی‌لیتر است، با این وجود اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در بررسی روز ۴۵ تیمار

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

آلژینات دارای بیش‌ترین میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (۲۰/۹۳±۲۴۲/۴۵ واحد بر میلی‌لیتر) در مقایسه با تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین قابل ذکر است که با افزایش طول دوره در تیمار آلژینات سدیم میزان کمپلمان افزایش معنی‌دار داشت درصورتی‌که در تیمار شاهد کاهش معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۲).



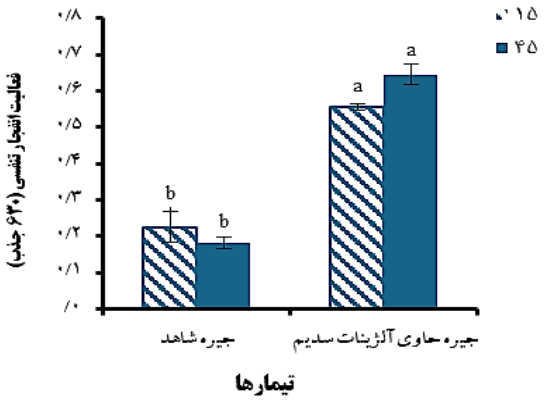
شکل ۱: شاخص فعالیت لیزوزیم قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی (میانگین±خطای استاندارد) در روزهای ۱۵ و ۴۵ آزمایش



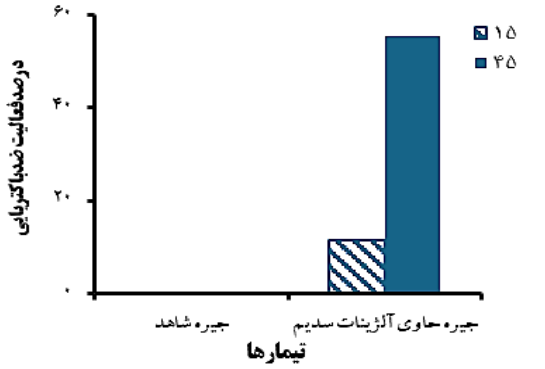
شکل ۲: شاخص فعالیت مسیر فرعی کمپلمان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی (میانگین±خطای استاندارد) در روزهای ۱۵ و ۴۵ آزمایش

نتایج حاصل از بررسی فعالیت انفجار تنفسی که در شکل ۳ ذکر شده است، نشان داد در بررسی روز ۱۵ آلژینات سدیم موجود در جیره باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت انفجار تنفسی ماهی‌ها (۰/۰۰±۰/۵۵ ۶۳۰جذب) در مقایسه با تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین در بررسی روز ۴۵ بیش‌ترین فعالیت انفجار تنفسی با میزان ۰/۰۲±۰/۶۴ (۶۳۰جذب) متعلق به تیمار آلژینات سدیم و دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). با این وجود مقایسه زمانی هر دو گروه نشان داد که میزان فعالیت انفجار تنفسی در تیمار آلژینات سدیم افزایش و در تیمار شاهد کاهش داشت.

شکل ۴ نتایج حاصل از بررسی درصد فعالیت باکتری‌کشی سرم خون ماهیان مورد مطالعه را در دو دوره سنجش ۱۵ و ۴۵ روز نشان می‌دهد. مقایسه نتایج به‌دست آمده در سنجش روز ۱۵ اختلاف معنی‌دار میان داده‌ها را نشان داد(P<۰/۰۵).به این صورت که بیش‌ترین فعالیت باکتری‌کشی ۱۱/۶۴ درصد و متعلق به سرم خون تیمار آلژینات سدیم و دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با تیمار شاهد بود. نتایج به‌دست آمده در روز ۴۵ نیز پیرو همین نتایج بود به گونه‌ای که تیمار آلژینات‌سدیم با بالاترین فعالیت باکتری‌کشی سرم یعنی ۲/۱۲±۵۵/۴۵ درصد با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین با افزایش طول دوره درصد فعالیت باکتری‌کشی سرم خون تیمار آلژینات سدیم در مقایسه با ابتدای دوره افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). درصد نسبی زنده‌مانی پس از مواجهه با دوز سمی ازن در پایان دوره آزمایش نشان داد که آلژینات سدیم با عملکرد مثبت در افزایش پارامترهای ایمنی غیراختصاصی و تقویت سیستم ایمنی منجر به مقاومت بچه‌ماهی‌ها در مقابل دوز سمی ازن و در نهایت افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی نسبی در مقایسه با تیمار شاهد گردید (P<۰/۰۵) (شکل ۵).

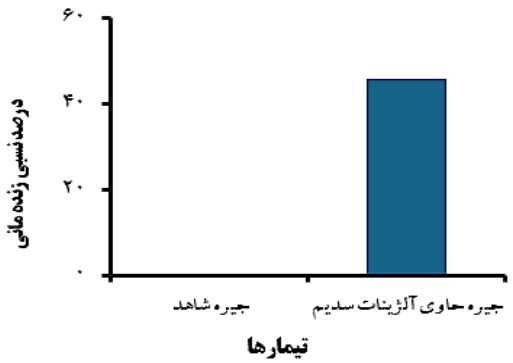


شکل ۳: شاخص فعالیت انفجار تنفسی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی (میانگین±خطای استاندارد) در روزهای ۱۵ و ۴۵ آزمایش



شکل ۴: شاخص درصد فعالیت ضدباکتریایی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی (میانگین±خطای استاندارد) در روزهای ۱۵ و ۴۵ آزمایش

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981



شکل ۵: شاخص درصد نسبی زنده‌مانی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی (میانگین ± خطای استاندارد) در روزهای ۱۵ و ۴۵ آزمایش بعد از مواجهه با دوز سمی ازن

بحث

استفاده از افزودنی‌های خوراکی محرک سیستم ایمنی و رشد در پرورش ماهی به‌منظور تأمین مواد لازم جهت رشد و افزایش توان سیستم ایمنی و پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌آور اهمیت یافته است. از این رو در بین محرک‌های ایمنی متعدد محرک‌های ایمنی با منشأ زیستی اهمیت ویژه‌ای دارند (Kapetanovic و همکاران، ۲۰۰۵). آلژینات سدیم از جمله محرک‌هایی می‌باشد که از جلبک‌های قهوه‌ای استحصال شده و طی مطالعات اخیر عملکردهای مثبت آن در زمینه‌های مختلف ازجمله مباحث مربوط به آبزیان به‌اثبات رسیده است. افزایش رشد و پاسخ‌های ایمنی و درنهایت مقاومت در برابر آلودگی باکتریایی در اثر استفاده از آلژینات سدیم در جیره هامور معمولی گزارش شده است (Yeh و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزودن آلژینات سدیم به‌عنوان افزودنی خوراکی به جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان سبب افزایش شاخص وزن نهایی در مقایسه با تیمار شاهد شده است. Yeh و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقی استفاده از آلژینات سدیم جیره بر شاخص‌های رشد در ماهیان انگشت‌قد معمولی و بهبود افزایش وزن را گزارش دادند. هم‌چنین Ashuori و همکاران (۲۰۱۸)، افزایش قابل ملاحظه‌ای در شاخص افزایش وزن بدن و میانگین وزن نهایی تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ۵ گرم بر کیلوگرم آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم و پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* مشاهده کردند. هم‌چنین آلژینات سدیم در دیگر شاخص‌های رشد در بچه‌ماهیان شامل ضریب تبدیل غذایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و فاکتور وضعیت هرچند که بهبود ایجاد کرده بود اما با این حال اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های ذکر شده گروه‌های آزمایش مشاهده نشد. هم‌سو با این نتایج، مطالعه‌ای توسط Cheng و همکاران (۲۰۰۸)، نشان داد که استفاده از جیره غذایی حاوی آلژینات سدیم در هامور قهوه‌ای *Epinephelus fuscoguttatus*، اختلاف معنی‌داری را در عملکرد رشد ماهی‌ها در طول دوره ایجاد نکرده است. هم‌چنین استفاده از آلژینات سدیم تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد در میگوی سفید غربی نداشت (Cheng و همکاران، ۲۰۰۵).

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که آلژینات سدیم می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد در بچه‌ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان شود. دلیل افزایش و بهبود رشد در اثر مصرف آلژینات سدیم می‌تواند به خاصیت پربیوتیکی آن مربوط باشد، اثر پربیوتیک‌ها بر عملکرد رشد ممکن است با افزایش قابلیت هضم مواد مغذی در نتیجه فعالیت جمعیت باکتری‌های بی‌هوازی دستگاه گوارش همراه باشد که می‌تواند منجر به افزایش آنزیم‌های گوارشی و فعالیت آن‌ها شود (نیسی و همکاران، ۱۳۹۲) که این امر موجب افزایش میزان هضم و جذب مواد مغذی در دستگاه گوارش میزبان می‌شود (Shan و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع اثرات مفید پربیوتیک‌ها به‌علت تولید فرآورده‌های حاصل از واکنش تخمیر باکتری‌های همزیست روده یا پروبیوتیک‌ها ایجاد می‌شود. در میان بسیاری از فواید پربیوتیک‌ها، تحریک سیستم ایمنی یکی از مزایای پیش‌بینی‌شده است و توانایی آن‌ها برای تحریک ایمنی سیستماتیک قابل توجه است. این مواد به‌طور مستقیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی ازجمله لیزوزیم و مسیر فرعی کمپلمان و دیگر اجزای سیستم ایمنی را افزایش می‌دهند (Robertfroid، ۲۰۰۷). فعالیت لیزوزیم در ماهیان بیش‌تر از پستانداران است و اغلب به‌عنوان شاخص مهمی از سیستم ایمنی ذاتی شناخته می‌شود (Sun، ۲۰۱۰).

در تحقیق حاضر، با توجه به نتایج به‌دست آمده، به‌طورکلی آلژینات سدیم طی دو دوره بررسی (۱۵ و ۴۵ روزه)، دارای اثر مثبت بر افزایش فعالیت لیزوزیم بچه‌ماهی‌ها و اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود. بنابراین تجویز رژیم غذایی حاوی آلژینات سدیم، تأثیر معنی‌دار بر شاخص فعالیت لیزوزیم سرم بچه‌ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت. در راستای نتایج حاصل، تزریق سدیم آلژینات در ماهی هامور معمولی باعث افزایش میزان فعالیت لیزوزیم سرم شد (Cheng و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین Ashuori و همکاران (۲۰۱۸) شاهد افزایش فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی سی‌باس دریایی تغذیه شده با آلژینات با وزن مولکولی پایین بودند. استفاده از آلژینات سدیم در جیره غذایی ماهی هامور قهوه‌ای، باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم در مقایسه با تیمار شاهد شد (Chiu و همکاران، ۲۰۰۸). Cheng و همکاران (۲۰۰۸) شاهد افزایش فعالیت لیزوزیم در ماهی هامور قهوه‌ای تغذیه شده با آلژینات سدیم بودند. هم‌چنین جیره غذایی حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی پایین، باعث افزایش قابل

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

ملاحظه میزان لیزوزیم در ماهی تیلاپیا نیل گردید. این مطالعه نشان داد که جیره حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم، می‌تواند باعث بیش‌ترین افزایش تحریک ایمنی در این ماهی شود (Van Doan و همکاران، ۲۰۱۶). باتوجه به خاصیت پربیوتیک آلژینات‌سدیم،می‌توان بیان کرد که پربیوتیک‌ها می‌توانندسیستم ایمنی بدن را از طریق تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره تحریک کنند، در واقع اسیدهای چرب می‌توانندبه‌عنوان منبع انرژی برای‌سلول‌های اپیتلیال‌روده عمل کنند. هم‌چنین می‌توانندنقش‌مهمی‌رادرارتباط‌بین‌میکروفلور روده‌و سیستم ایمنی بدن از مسیرهای مختلف رونویسی و تحریک سیستم ایمنی داشته باشند (Corrêa-Oliveira و همکاران، ۲۰۱۶). از طرفی افزایش میزان لیزوزیم عموماً در نتیجه افزایش تعدادسلول‌های‌بیگانه‌خوار است (Sahoo و همکاران، ۲۰۰۵).بنابراین‌ممکن‌است افزایش‌میزان لیزوزیم درنتیجه مصرف آلژینات سدیم از طریق افزایش تعداد فاگوسیت‌های ترشح‌کننده لیزوزیم یا افزایش مقدار لیزوزیم سنتز شده در سلول باشد.

یکی دیگر از شاخص‌های ایمنی، فعالیت مسیر فرعی کمپلمان است. سیستم کمپلمان شامل بیش از ۳۵ نوع پروتئین محلول در پلاسما و یکی از قوی‌ترین پاسخ‌های غیرسلولی در سیستم ایمنی بدن است (Song و همکاران، ۲۰۱۴). براساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در بچه‌ماهی‌های تغذیه شده با آلژینات سدیم در هر دو دوره بررسی بیش‌تر از تیمار شاهد بود. به این صورت که در بررسی دوره اول با وجود این‌که میزان فعالیت مسیر فرعی در تیمار آلژینات سدیم بیش‌تر بود ولی اختلاف معنی‌دار دیده نشد درصورتی‌که در بررسی دوره دوم روند افزایشی فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در تیمار آلژینات سدیم در مقایسه با روند کاهشی تیمار شاهد، اختلاف معنی‌دار داشتند، بنابراین می‌توان چنین گفت که تجویز آلژینات سدیم، می‌تواند بر شاخص فعالیت مسیر فرعی کمپلمان تأثیر مثبت داشته باشد. این نتایج مطابق با نتایج به‌دست آمده در سایر تحقیقات می‌باشد به گونه‌ایی که Van Doan و همکاران (۲۰۱۶) پس از بررسی شاخص‌های ایمنی ماهی تیلاپیای تغذیه شده با جیره حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم، افزایش معنی‌دار شاخص مسیر فرعی کمپلمان را گزارش دادند. هم‌چنین تجویز رژیم غذایی‌آلژینات‌سدیم استحصال‌شده از جلبک‌های‌قهوه‌ای، *Laminaria digitata* و *Ascofillum nodosum* میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان را افزایش داد (Bagni و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از جیره‌های حاوی آلژینات سدیم با وزن مولکولی پایین به‌همراه قارچ کفیر در تغذیه ماهی تیلاپیا نیل به‌طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت کمپلمان شد (Van Doan و همکاران، ۲۰۱۷). با توجه به افزایش اجزای ایمنی غیراختصاصی شامل لیزوزیم و کمپلمان و فعالیت آن‌ها در ماهی‌های تغذیه شده با آلژینات سدیم، می‌توان چنین گفت که آلژینات سدیم مورد آزمایش دارای خاصیت تحریک کنندگی برای سیستم ایمنی می‌باشد و در واقع مکانسیم و نحوه تأثیر آن را می‌توان چنین بیان کرد که تحریک سیستم ایمنی ذاتی از طریق بیان گیرنده‌های شناسایی پاتوژن در سطح ماکروفاژها، مانند گیرنده‌های بتاگلوکان و دنتین-۱، انجام شده است. نتیجه این تعامل لیگاند و گیرنده، فعال شدن مولکول‌های انتقال سیگنال، مانند NF-kB می‌باشد که سلول‌های ایمنی را در مسیرهای بعدی تحریک می‌کنند (Yadav و Schorey، ۲۰۰۲). نتیجه این مکانسیم به‌طور مستقیم، فعال‌سازی ماکروفاژ، نوتروفیل، مسیر فرعی کمپلمان و افزایش فعالیت لیزوزیم یا برقراری ارتباط با الگوهای مولکولی میکروبی برای فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی بدن در مراحل بعدی می‌باشد (Song و همکاران، ۲۰۱۴). محرک‌های ایمنی هم‌چنین‌ممکن است‌با گیرنده‌های تشخیص‌الگو در فرم الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب، مانند تیکوئیک اسید، پپتیدوگلیکان و پلی‌ساکارید کپسول باکتری، باعث ایجاد پاسخ ایمنی شوند (Bron و همکاران، ۲۰۱۲). به‌طورکلی در ماهیان، همانند پستانداران فعالیت مسیر فرعی کمپلمان تحت تاثیر پروتئین‌ها و به‌خصوص پروتئین C3 می‌باشد.ازسوی‌دیگر ترکیبات‌گیاهی‌که شامل گروه‌های هیدروکسیل، آمین، کربوهیدرات و پروتئین هستند،باعث افزایش‌میزان‌فعالیت مسیر فرعی کمپلمان می‌شوند (Bobadilla و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که آلژینات سدیم به‌دلیل گروه‌های هیدروکسیل زیادی‌که در ساختار خود دارد باعث افزایش میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان شده است.

فعالیت‌انفجار‌تنفسی‌نیز‌یکی‌ازشاخص‌های با اهمیت‌در تشخیص مقاومت‌و ایمنی می‌باشد.در این پدیده گونه‌های سمی و فعال اکسیژن (ROS) ازجمله سوپراکسید، باعث از بین رفتن باکتری‌های به دام افتاده در فعالیت فاگوسیتوزها می‌شوند. نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان فعالیت انفجار تنفسی ماهی‌های تیمار آلژینات سدیم با تیمار شاهد طی دو دوره بررسی (۱۵ و ۴۵ روز) را نشان داد. در این راستا محققان نتایج مشابهی از اثر آلژینات سدیم بر ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coicoides*) (Yeh و همکاران،۲۰۰۸)،وآبالون تایوانی (*Haliotis diversicolor supertexta*) (Cheng و همکاران، ۲۰۱۳)، ماهی هامور قهوه‌ای (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Chiu و همکاران، ۲۰۰۸)، میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (Cheng و همکاران، ۲۰۰۴)، هم‌چنین اثر قارچ کفیر و آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم بر ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) (Van Doan و همکاران، ۲۰۱۷)، و نیز آلژینات سدیم و کاراژنین بر ماهی هامور قهوه‌ای (Cheng و همکاران، ۲۰۰۸) را گزارش دادند. هم‌چنین در بررسی دوم میزان فعالیت در تیمار آلژینات سدیم افزایش چشم‌گیری داشت. مشابه این نتیجه

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

Van Doan و همکاران (۲۰۱۶)، میزان انفجار تنفسی در ماهی تیلاپیا نیل تغذیه شده با آلژینات سدیم با وزن مولکولی کم و *Lactobacillus plantarum* را طی دو مرحله بررسی کردند که نتایج حاصل افزایش قابل ملاحظه فعالیت انفجار تنفسی را در بررسی دوره دوم نشان داد.

فعالیت باکتری‌کشی سرم یکی‌دیگر از معیارهای سنجش شرایط ایمنی و سلامت ماهی می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سرم خون بچه‌ماهی‌های تغذیه شده با تیمار آلژینات سدیم فعالیت باکتری‌کشی بیش‌تری در مقایسه با تیمار شاهد داشت. هم‌چنین در بررسی دوره دوم فعالیت باکتری‌کشی سرم ایجاد شده در تیمار آلژینات سدیم افزایش چشم‌گیری در مقایسه با دوره اول داشت. در این راستا در مطالعه‌ای استفاده از جیره‌های حاوی آلژینات سدیم با وزن‌مولکولی‌کم‌در تغذیه بچه‌ماهی سی‌باس دریایی *Lates calcalifer*، درصد فعالیت باکتری‌کشی سرم را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد (Ashuori و همکاران، ۲۰۱۸). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق موید آن است که درصد فعالیت باکتری‌کشی سرم خون بچه‌ماهی‌ها در تیمار آلژینات سدیم با اختلاف زیادی از تیمار شاهد بیش‌تر است که این نتیجه مطابق با افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان در همین تیمار است. در واقع فعالیت باکتری‌کشی سرم که نوعی پاسخ ایمنی غیر اختصاصی برای مهار رشد میکروارگانیسم‌های مهاجم است، می‌تواند بیانگر حضور پروتئین‌های موجود در خون ماهی مانند کمپلمان، پروتئین‌های فاز حاد، لیزوزیم، ترانسفرین‌ها و آنتی‌پروتئازها باشد (Yano و همکاران، ۱۹۹۶). از طرفی فاگوسیت‌ها مانند نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها نقش مهمی در دفاع ضدباکتریایی سرم ایفا می‌کنند. این سلول‌ها با مصرف و از بین بردن باکتری از طریق تولید گونه‌های فعال یا واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) ازجمله آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن‌ورادیکال‌های‌هیدروکسیل‌درانفجار‌تنفسی‌باکتری‌را‌می‌کشند (Akhter و همکاران، ۲۰۱۵)، بنابراین فعالیت باکتری‌کشی سرم قابل توجه تیمارهای آلژینات سدیم ممکن است در اثر افزایش سلول‌های ایمنی ذکر شده و افزایش فعالیت انفجار تنفسی رخ داده باشد.

هم‌چنین آلژینات سدیم موجود در جیره غذایی بچه‌ماهی‌ها باعث افزایش قابل ملاحظه مقاومت آن‌ها در برابر تنش حاصل از دوز سمی ازن شد. در راستای این نتایج تحقیقاتی وجود دارد که مقاومت گونه‌های مختلف آبزی را در شرایط استرس در برابر عوامل پاتوژن به چالش کشیده‌اند. Cheng و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی روی سطوح مختلف آلژینات سدیم، شاهد اختلاف معنی‌دار در میزان زنده‌مانی میگوی سفید غربی، در مقابل باکتری *Vibrio alginolyticus*، بودند. استفاده‌خوراکی از آلژینات‌سدیم در ماهی هامور قهوه‌ای،باعث افزایش میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان و آنزیم لیزوزیم سرم و مقاومت در برابر باکتری .*Streptococcus* sp و .*Iridovirus* sp شد (Chiu و همکاران، ۲۰۰۸). در مجموع با توجه به انطباق افزایش شاخص‌های لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و انفجار تنفسی با افزایش فعالیت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای آلژینات سدیم می‌توان چنین نتیجه گرفت که این ماده باعث افزایش و بهبود شاخص‌های ایمنی ذاتی و در نهایت افزایش سلامت و ایمنی بچه‌ماهیان قزل‌آلا شده و توانسته زنده‌مانی آن‌ها را در مواجهه با عامل سمی ازن افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از حمایت‌های پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان در جهت انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

۱. **زارع‌حقیقی، ا.؛ قلیچی، ا. و جرجانی، س.، ۱۳۹۵.** اثرات جایگزینی‌روغن‌های گیاهی با روغن‌ماهی در جیره‌غذایی‌بر آنزیم‌های کبدی‌وسرم‌وبافت‌کبدماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. شماره ۴، صفحات ۶۹ تا ۸۹.

۲. **نیسی، ع.؛ رفیعی، غ.ر.؛ نعمت‌اللهی، م.ع. و رضوی، س.ه.، ۱۳۹۲.** تأثیر پروبیوتکی باکتری *Pediococcus acidilactici* در شاخص‌های‌رشد،فعالیت‌آنزیمی‌دستگاه‌گوارش‌وترکیب بیوشیمیایی کل لاشه بچه ماهی گرین ترور *Aequidens rivulatus*. مجله منابع طبیعی ایران. شماره ۴، صفحات ۶۳۵ تا ۶۴۸.

۳. **Agüero, L.; Zaldivar-Silva, D.; Pe˜na, L. and Dias, M., 2017.** Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. Carbohydrate Polymers. Vol. 168, pp: 32-43.

۴. **Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A.M. and Mohsin, M., 2015.** Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 45, No. 2, pp: 733-741.

۵. **Ashouri, G.; Soofiani, N.M.; Hoseinifar, S.H.; Jalali, S.A.H.; Morshedi, V.; Van Doan, H. and Mozanzadeh, M.T., 2018**. Combined effects of dietary low molecular weight sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on growth performance, haematological and innate immune responses of Asian sea bass (*Lates calcalifer*) juveniles. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 79, pp: 34-41.

۶. **Bagni, M.; Romano, N.; Finoia, M.G.; Abelli, L.; Scapigliati, G.; Tiscar, P.G.; Sarti, M. and Marino, G., 2005.** Short-and long-term effects of a dietary yeast β-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan)

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

۱۶. **Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J.L., Vieira, A., Sato, F.T. and Vinolo, M.A.R., 2016.** Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. Clinical and Translational immunology. Vol. 5, No. 4, pp: 73.

۱۷. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assays. Techniques in Fish Immunology. Vol. 1, pp: 101-103.

۱۸. **Kajita, Y.; Sakai, M.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1990.** The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology. Vol. 25, No. 2, pp: 93-98.

۱۹. **Kapetanovic, D.; Kurtovic, B. and Teskeredzic, E., 2005.** Difference in bacterial population in raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fry after transfer from incubator to pools. Food Technology Biotechnology. Vol. 48, pp: 189-193.

۲۰. **Kelishomi, Z.H.; Goliaei, B.; Mahdavi, H.; Nikoofar, A.; Rahimi, M.; MoosaviMovvahedi, A.A.; Mamashli, F. and Bigdeli, B., 2016.** Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. Food Chemistry. Vol. 196, pp: 897-902.

۲۱. **Langlais, B.; Recknow, D.A. and Brink, D.R., 1991.** Ozone in water treatment: Application and engineering. Lewis Pablishers. 569 p.

۲۲. **Milla, S.; Mathieu, C.; Wang, N.; Lambert, S.; Nadzialek, S.; Massart, S.; Henrotte, E.; Douxfils, J.; Mélard, C.; Mandiki, S.N.M. and Kestemont, P., 2010**. Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 28, No. 6, pp: 931-941.

۲۳. **Roberfroid, M., 2007.** Prebiotics: the concept revisited. Journal of Nutrition. Vol. 137, No. 3, pp: 830-837.

۲۴. **Sado, R.Y.; Bicudo, Á.J.D.A. and Cyrino, J.E.P., 2008.** Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 39, No. 6, pp: 821-826.

۲۵. **Sahoo, P.K.; Kumari, J. and Mishra, B.K., 2005.** Non specific immune responses in juveniles of Indian major carps. Applied Ichthyology. Vol. 21, No. 2, pp: 151-155.

۲۶. **Salze, G.; McLean, E.; Schwarz, M.H. and Craig, S.R., 2008.** Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture. Vol. 274, pp: 148-152.

۲۷. **Secombes, C.J., 1990.** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. Techniques in Fish Immunology. Vol. 1, pp: 137-154.

۲۸. **Shan, X.; Xiao, Z.; Huang, W. and Dou, S., 2008.** Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 18, No. 4, pp: ۳۱۱-۳۲۵.

۷. **Bobadilla, A.S.; Llopis, S.P.; Requeni, P.G.; Médale, F.; Kaushik, S. and Sánchez, J.P., 2005.** Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. Vol. 249, No. 4, pp: 387- 400.

۸. **Bullock, G.L.; Summerfelt, S.T.; Noble, A.C.; Weber, A.L.; Durant, M.D. and Hankins, J.A., 1997.** Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. Aquaculture. Vol. 158, pp: 43-55.

۹. **Bron, P.A.; Van Baarlen, P. and Kleerebezem, M., 2012.** Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. Nature Reviews Microbiology. Vol. 10, No. 1, pp: 66-69.

۱۰. **Cheng, A.C.; Tu, C.W.; Chen, Y.Y.; Nan, F.H. and Chen, J.C., 2007.** The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coicoides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 22, pp: 197-205.

۱۱. **Cheng, A.C.; Chen, Y.Y. and Chen, J.C., 2008.** Dietary administration of sodium alginate and k-carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 121, pp: 206-215.

۱۲. **Cheng, W.; Liu, C.H.; Kuo, C.M. and Chen, J.C., 2005.** Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 18, pp: 1-12.

۱۳. **Cheng, W.; Liu, C.H.; Yeh, S.T. and Chen, J.C., 2004.** The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 17, pp: 41-51.

۱۴. **Cheng, W. and Yu, J.S., 2013.** Effects of the dietary administration of sodium alginate on the immune responses and disease resistance of Taiwan abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 34, pp: 902-908.

۱۵. **Chiu, S.T.; Tsai, R.T.; Hsu, J.P.; Liu, C.H. and Cheng, W., 2008.** Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Aquaculture. Vol. 277, No. 2, pp: 66-72.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

in miiuy croaker larvae and juveniles. Aquaculture. Vol. 281, No. 4, pp: 70-76.

۲۹. **Song, S.K.; Beck, B.R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H.D. and Ringø, E., 2014.** Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 40, No. 1, pp: 40-48.

۳۰. **Sun, Y.Z.; Yang, H.L.; Ma, R.L. and Lin, W.Y., 2010.** Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 29, No. 5, pp: 803-809.

۳۱. **Van Doan, H.; Tapingkae, W.; Moonmanee, T. and Seepai, A., 2016.** Effects of low molecular weight sodium alginate on growth performance, immunity, and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 55, pp: 186-194.

۳۲. **Van Doan, H.; Hoseinifar, S.H.; Tapingkae, W.; Tongsiri, S. and Khamtavee, P., 2016.** Combined administration of low molecular weight sodium alginate boosted immunomodulatory, disease resistance and growth enhancing effects of *Lactobacillus plantarum* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 58, pp: 678-685.

۳۳. **Van Doan, H.; Hoseinifar, S.H.; Tapingkae, W. and Khamtavee, P., 2017.** The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 62, pp: 139-146.

۳۴. **Yadav, M. and Schorey, J.S., 2006.** The β-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. Blood. Vol. 108, No. 9, pp: 3168-3175.

۳۵. **Yano, T., 1996.** The nonspecific immune system: humoral defense. The Fish Immune System: Organism, Pathogen & Environment. Vol. 1, pp 105-157.

۳۶. **Yeh, S.P.; Chang, C.A.; Chang, C.Y.; Liu, C.H. and Cheng, W., 2008.** Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coiodes*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 25, No. 2, pp: 19-27.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129981

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Effect of Sodium Alginate on Non-Specific Immune Parameters and Resistance to Ozone Toxicity in Rainbow Trout Fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*)

- **Samira Salarvand:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- **Seyed Amir Hossein Jalali*:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
  : Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- **Nasrollah Mahboobi Soofiani:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- **Alireza Alafchian:** Research Institute for Nanotechnology and Advanced Materials, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: October 2019 Accepted: January 2020

Key words: Prebiotic, Sodium Alginate, Rainbow trout, Non-specific Immune System

Abstract

Sodium alginate, an anionic polysaccharide, is now considered a new prebiotic due to its immune-stimulating and growth-promoting properties. This study has investigated the effects of sodium alginate on non-specific immune system parameters and growth performance in the rainbow trout fingerling. For these purposes, 90 rainbow trout (3±0.3 g) were fed 3% of body weight with a diet that contain 2.5 g/kg sodium alginate for 45 days. The growth factors and non-specific immune system parameters includes lysozyme, Alternative complement activity (ACH50), bactericidal and respiratory burst activity were investigated in days 15 and 45. At the end of the rearing period, treatments exposed to the toxic dose of ozone. The results showed that the fish feed with diet contain sodium alginate had not significant differences with control treatment on body weight gain, food conversion factor, specific growth rate, condition factor ($P>0.05$) but there was significant differences in final weight gain ($P<0.05$). On both days, 15 and 45, sodium alginate caused the significant increase in lysozyme activity, alternative complement activity, respiratory burst activity and bactericidal of rainbow trout compared to the control treatment ($P<0.05$). Furthermore, when the treatments exposed to toxic dose of the ozone, sodium alginate increased relative percent survival compared to the control treatment. According to the results, using of the sodium alginate in diet improved the performance of the immune system, increased the fish's resistance to the toxic level of ozone and finally increased the relative percent survival in rainbow trout fingerling.

* Corresponding Author's email: sahjalali@cc.iut.ac.ir