تأثیر تجویز خوراکی عصاره الکلی بره موم زنبورعسل بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

*سکینه ولی‌پور[۱]، مهرزاد مصباح[۲]، مهران جواهری‌بابلی[۳] و مجتبی علیشاهی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، اهواز، ایران، [۲]دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، [۳]گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، اهواز، ایران، [۴]دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲٤

چکیده

در این پژوهش اثر عصاره الکلی بره موم زنبورعسل بر برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۳۰۰ فینگرلینگ ماهی کپور (با وزن اولیه ۱۰±۵۰ گرم) به ٤ گروه تقسیم شده و با جیره غذایی شاهد و سه غلظت ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد عصاره الکلی بره موم (در ۳ تکرار) با خوراک مخلوط شده و ماهی‌ها به‌مدت ٦۰ روز با این خوراک تغذیه گردیدند. نمونه‌های خون در روزهای ۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ روز تهیه و فعالیت لیزوزیم سرم و قدرت باکتری‌کشی سرم، پروتئین تام، سطح آلبومین و گلوبولین سرم اندازه‌گیری گردیدند. در انتهای دوره، تست رویارویی باکتریایی با باکتری *Aeromonas hydrophila* انجام شد و میزان تلفات به‌مدت ۱۰ روز ثبت گردید. نتایج پژوهش نشان داد که جیره ۰/۵ درصد عصاره الکلی بره موم باعث افزایش معنی‌دار در لایزوزیم سرم، پروتئین کل و گلوبولین می‌گردد (P<۰/۰۵). تلفات بعد از تست رویارویی باکتریایی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا نیز در تیمار ۰/۵ درصد عصاره الکلی بره موم کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ولی در تیمار ۰/۲۵ و ۰/۱ درصد تلفات معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مناسب‌ترین غلظت عصاره الکلی بره موم در جیره برای تحریک ایمنی و افزایش مقاومت در برابر تست رویارویی باکتریایی در ماهی کپور معمولی، غلظت ۰/۵ درصد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بره موم، *Cyprinus carpio*، تست رویارویی باکتریایی، پاسخ‌های ایمنی

مقدمه

یکی از مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری ایران با آن روبرو است، مسأله بروز بیماری‌ها در اثر آشنا نبودن با اصول پرورش آبزیان در مناطق مختلف است که موجب شیوع بیماری و خسارت‌های فراوان می‌شود. در پرورش آبزیان، پیش‌گیری از وقوع بیماری‌ها از طریق اجرای صحیح برنامه‌های امنیت زیستی اهمیت بسیار زیادی دارد و اگر نقصانی در این خصوص پیش آید، بیماری به‌وقوع می‌پیوندد. اطمینان از عملکرد سیستم ایمنی در حد مطلوب موجب کنترل بیماری‌ها و کاهش تلفات و خسارت‌ها می‌گردد. اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهیان پرورشی برای افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها رایج شده است و به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از جهت‌های مختلف تهدیدی برای انسان و محیط زیست می‌باشد. افزایش باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تخریب و تهدید محیط زیست به‌ویژه در مواقعی که

* مسئول مکاتبه: valypour_s5742@yahoo.com

آنتی‌بیوتیک به آب‌های سطحی راه یابد و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی‌ترین تهدیدهای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند (علیشاهی، ۱۳۸۳). کپورماهیان یکی از خانواده‌های مهم ماهیان هستند که با داشتن بیش از ۲۰۰۰ گونه در چهار قاره جهان پراکنش یافته‌اند (Kirpichnikov، ۱۹۷۲). ماهی کپور معمولی دارای ارزش شیلاتی بالایی است و پرورش آن نیز در کشور انجام می‌شود. صید سالانه آن تقریباً ۲۰۰ هزار تن بالغ می‌گردد. در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی در مورد ویژگی‌های فرآورده‌های طبیعی ضدمیکروبی اختصاصی برای معالجه عفونت‌های میکروبی منتشر شده که یکی از موارد قابل ملاحظه، بره موم یا پروپولیس است. بره موم یا پروپولیس ماده‌ای شبیه موم و از تولیدات زنبورعسل است که ظاهر آن به‌دلیل دخالت عوامل زیادی، به‌طور گسترده‌ای ممکن است متفاوت باشد (Fernandes، ۲۰۰۷). اما به‌طور معمول حالت آن خمیری و رنگ آن از سبز، قرمز تا قهوه‌ای تیره متفاوت است. پروپولیس دارای بوی مطبوع و خاصیت چسبندگی است که به‌دلیل واکنش قوی آن با چربی‌ها و پروتئین‌های پوست می‌باشد (Tosi و همکاران، ۱۹۹۶). Cuesta و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند که نرخ ویژه رشد به‌طور معنی‌دار در ماهی *Seabream gilthead* تغذیه شده با غذای شامل بره موم تغییر نمی‌کند (Cuesta و همکاران، ۲۰۰۵). Beyraghdar Kashkooli و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر عصاره بره موم بر عملکرد جیره، بازماندگی و برخی فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند در بین پارامترهای بیوشیمیایی تنها نسبت: آلبومین و گلوبولین در ماهیان تغذیه شده با جیره شامل ۱/۵ گرم عصاره بره موم به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). نتایج به‌دست آمده از تست NBT اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از عصاره الکلی بره موم در جیره در سطح نام برده بر عملکرد رشد و سلامت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد آزمایش تأثیر نداشت، همچنین استفاده از این ماده سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد. بنابراین با توجه به اطلاعات بسیار محدود در مورد اثرات بره موم در حیوانات خونسرد به‌ویژه آبزیان، در این پژوهش اثرات عصاره الکلی بره موم بر تحریک ایمنی و تست رویارویی باکتریایی در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی: تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی ۱۰±۵۰ گرمی مورد نیاز از مجتمع پرورش ماهی آزادگان ماهیان واقع در ۲۰ کیلومتری جاده اهواز-آبادان تهیه گردید. این ماهی‌ها با استفاده از مخازن مخصوص ماهی پلاستیکی و اکسیژن خالص به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند. به‌مدت یک هفته سازش‌دهی ماهی با شرایط آکواریوم و غذای دستی انجام شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در پژوهش به قرار زیر بود. دما: ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول: ۸-۱۰ ppm؛ pH: ۷/۹±۰/۳؛ NO_2<۰/۰۱ ppm؛ NH_3<۰/۱ ppm و میزان تعویض روزانه آب ۱۰ درصد حجم آب بود. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی در ٤ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۲۵ قطعه بچه‌ماهی در آکواریوم ۱۰۰ لیتری) به‌شرح زیر تقسیم شدند (Deng و همکاران، ۲۰۱۱؛ Azza و Abd-El-Rhman، ۲۰۰۹).

تیمار A: تغذیه شده با جیره شامل عصاره الکلی با غلظت ۱ گرم در کیلوگرم.

تیمار B: تغذیه شده با جیره شامل عصاره الکلی بره موم با غلظت ۲/۵ گرم در کیلوگرم.

تیمار C: تغذیه شده با جیره شامل عصاره الکلی بره موم با غلظت ۵ گرم در کیلوگرم.

تیمار D: گروه شاهد.

همه تیمارها با جیره‌های مشخص شده به‌مدت ٦۰ روز تغذیه گردیدند.

تهیه عصاره الکلی بره موم: ۱۰۰ گرم بره موم جامد را در ۱ لیتر الکل سفید ۹۶ درجه سانتی‌گراد حل کرده و یک روز در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد آن را با کاغذ صافی ۱۲ میکرون فیلتر کرده و این کار ۲ بار تکرار می‌شود. سپس آن را به‌مدت ٦ ساعت در Banmari ساخت ممرت آلمان در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. عصاره آماده شده را درون ظرف تیره و در بسته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری می‌شود (Deng و همکاران، ۲۰۱۱).

تهیه جیره شامل عصاره الکلی بره موم: میزان ۱ کیلوگرم جیره ماهی کپور معمولی، در یک سینی پلاستیکی پخش شده و میزان مناسب عصاره الکلی بره موم برای ایجاد غلظت پیش‌بینی شده (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) در پژوهش، روی خوراک اسپری می‌شود. سپس خوراک کاملاً مخلوط شده و دوباره این کار انجام می‌شود تا میزان مشخص شده بره موم به‌طور همگن در خوراک توزیع گردد. خوراک شامل عصاره بره موم را به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار می‌دهیم تا خشک شود. خوراک حاصل در نایلون پلاستیکی بسته‌بندی شده و در یخچال تا هنگام مصرف نگهداری می‌گردد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰).

۱۰ سی‌سی از عصاره الکلی را ابتدا در پتری‌دیش قرار داده شده سپس آن را وزن کرده است. با حذف وزن پتری‌دیش وزن عصاره به‌دست می‌آید. سپس آن را حرارت داده تا کل الکل تبخیر شده تا ماده خشک شده آن در ته ظرف باقی بماند. عصاره خشک شده را دوباره وزن کرده، وزن عصاره خشک شده در ۱۰ سی‌سی مایع الکلی حاصل می‌گردد. حال براساس وزن ماده خشک مقدار مورد نظر از عصاره الکلی را به‌دست آورده و به غذای تیمارها به‌صورت اسپری اضافه می‌گردد. تهیه جیره با غلظت ۰/۱ درصد عصاره الکلی: ٦ سی‌سی از عصاره الکلی را در ۱ کیلوگرم جیره به‌صورت اسپری بر روی غذا ریخته می‌شود و آن را در هوای آزاد به‌مدت ۲ روز قرار داده تا خشک شود. تهیه جیره با غلظت ۰/۲۵ درصد عصاره الکلی: ۱۵ سی‌سی از عصاره الکلی را در ۱ کیلوگرم جیره به‌صورت اسپری بر روی غذا ریخته می‌شود و آن را در هوای آزاد به‌مدت ۲ روز قرار داده تا خشک شود. تهیه جیره با غلظت ۰/۵ درصد عصاره الکلی: ۳۰ سی‌سی از عصاره الکلی را در ۱ کیلوگرم جیره به‌صورت اسپری بر روی غذا ریخته می‌شود و آن را در هوای آزاد به‌مدت ۲ روز قرار داده تا خشک شود.

خون‌گیری: در روزهای صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ پژوهش و بعد از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده بیهوشی MS222 با دوز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر، به‌وسیله سرنگ انسولین با استفاده از ماده ضدانعقاد هپارین و از ورید ساقه دمی خون‌گیری انجام شد در هر مرحله از ۹ ماهی نمونه خون تهیه گردید، نمونه مربوط به آزمایش‌های ایمنی به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس سرم آن با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جداسازی گردید. سرم‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (Schaperclaus، ۱۹۹۹).

آزمایش‌های انجام شده روی نمونه‌ها

روش رویارویی[1]: بعد از پایان دوره، ۱۰ قطعه ماهی در هر تیمار با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا به‌میزان دو برابر دوز ایجادکننده ۵۰ درصد تلفات به روش تزریق داخل صفاقی، تزریق گردیدند. به این منظور باکتری آئروموناس هیدروفیلا که در محیط TSB کشت داده شده بود به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، باکتری در فاز رشد لگاریتمی به‌وسیله سانتریفوژ از محیط جدا و در سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد. با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی به‌میزان ٤×۱۰^{۷} تنظیم گردید. تعداد تلفات روزانه به‌مدت ۱ هفته ثبت شده و در انتها تلفات تجمعی هر تیمار مشخص و مقایسه گردید (Bagenal، ۱۹۷۸).

1- Challenge

اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی

اندازه‌گیری توتال پروتئین و گلوبولین: میزان پروتئین کل به روش توصیه شده توسط Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و میزان گلوبولین سرم به روش توصیه شده توسط Swain و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری گردید. میزان پروتئین کل سرم براساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) با استفاده از کیت استاندارد تخمین پروتئین (Zistchem Diagnostics/Iran) تعیین شد. برای تخمین گلوبولین ۵۰ میکرولیتر محلول سولفات آمونیوم اشباع به‌صورت قطره‌قطره به ۵۰ میکرولیتر سرم به‌صورت گردابی اضافه می‌شود. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه انجام می‌شود. سپس ۲۰ میکرولیتر از این نمونه با ۸۰ میکرولیتر بافر بیکربنات-کربنات (pH=۹/۳) حل می‌شود و میزان پروتئین با کیت تخمین پروتئین استاندارد تعیین می‌شود. میزان کل گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین به‌دست آمده ثانویه از پروتئین کل سرم به‌دست می‌آید.

اندازه‌گیری آلبومین: مقادیر آلبومین توسط کیت‌های تجاری زیست‌شیمی و به روش Bradford (۱۹۷٦) انجام شد.

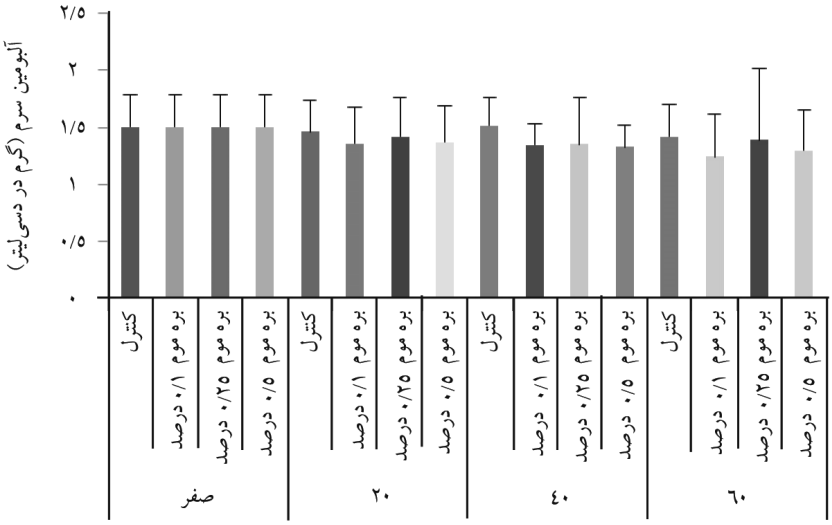
اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش توبیدومتری که توسط Ellis (۱۹۹۰) و Obach (۱۹۹۳) توصیه شده است با مقداری تغییرات استفاده گردید. در این روش، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سرم یا موکوس نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=٦/۲) در گوده‌های پلیت الایزا مخلوط می‌گردد و جذب نوری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۱ و ٦ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ٥٦۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. فعالیت لایزوزیم باعث لیز شدن باکتری و کاهش جذب نوری می‌گردد. یک واحد فعایت لایزوزیم با میزان کاهش جذب نوری به‌میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه در هر میلی‌لیتر سرم مشخص می‌شود.

اندازه‌گیری میزان فعالیت باکتری‌کشی سرم Bactericidal activity: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به‌مدت ٤۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون به‌دست آمده در طول موج ٥٤۰ نانومتر برابر ۱ تنظیم گردید. تعداد باکتری در سوسپانسیون حاصل شمارش شده و با استفاده از روش تهیه رقت‌های متوالی بر مبنای ۱۰، سوسپانسیون 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH=۷/۵ و شامل ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم) تهیه گردید. نمونه‌های سرمی با نسبت ۱:۳ با بافر بالا رقیق گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی به‌دست آمده با نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده ترکیب و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرارت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در ۳ تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج به‌صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر ۳ تکرار برای هر نمونه گزارش می‌شود.

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: از نرم‌افزار SPSS ویرایش ١٦ برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از تست ANOVA یک‌طرفه و تست چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین استفاده شد.

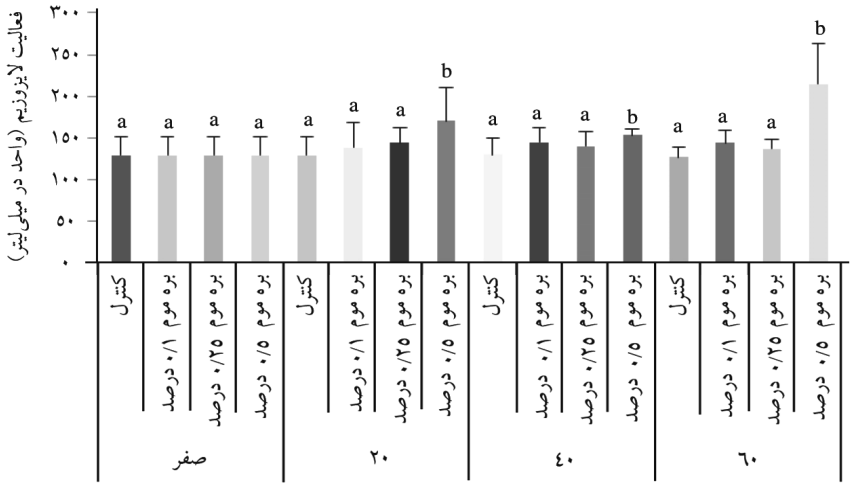
نتایج

میـزان آلبـومین: مقایسـه میـزان آلبـومین سـرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم در غلظـت‌هـای ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ درصـد و کنتـرل در شـکل ۱ آورده شـده است. نتایج پژوهش نشان داد که تـأثیر بـره مـوم بـر روی میزان سـرم آلبـومین مـاهی کپـور در تیمارهـای مختلف غذایی معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).



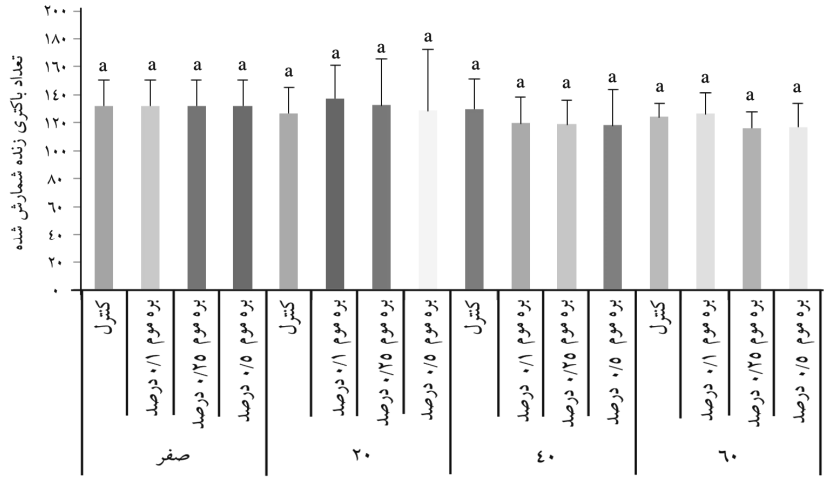
شکل ۱- نتایج مربوط به میزان آلبومین سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم.

میـزان لایـزوزیم سـرم: نتـایج انـدازه‌گیـری میـزان لایزوزیم در شکل ۲ آورده شده است؛ تیمـار عصـاره الکلی ۰/۵ درصد در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ پـژوهش باعـث افـزایش معنـی‌داری فعالیـت لایـزوزیم سـرم گردیده است (P<۰/۰۵)، اما در تیمار عصـاره الکلـی ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد نسبت بـه تیمـار کنتـرل افـزایش معنی‌دار فعالیت لایـزوزیم در روزهـای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ مشاهده نگردیده است (P>۰/۰۵).



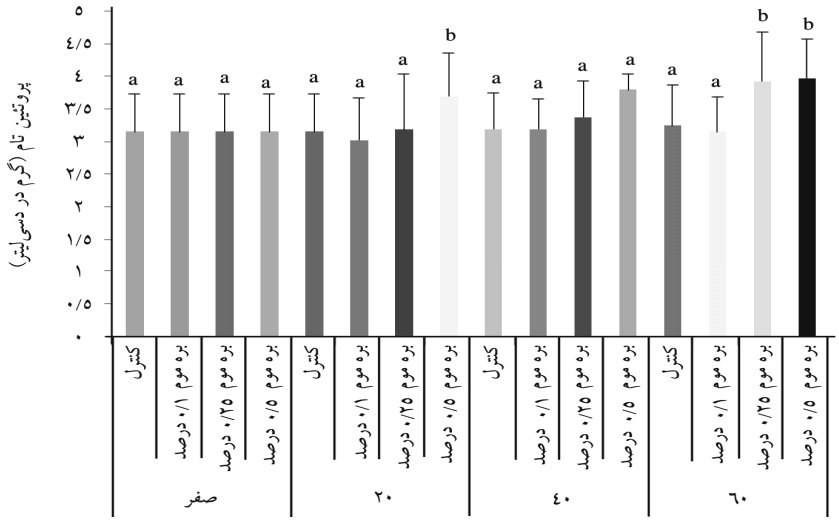
شکل ۲- نتایج مربوط به میزان فعالیت لایزوزیم سرم درتیمارهای عصاره الکلی بره موم.

قدرت باکتری‌کشی سرم: مقایسه قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ درصد و کنترل در شکل ۳ آورده شده است. نتایج پژوهش نشان داد که تأثیر بره موم بر روی میزان قدرت باکتری‌کشی سرم ماهی کپور در تیمارهای مختلف غذایی معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).



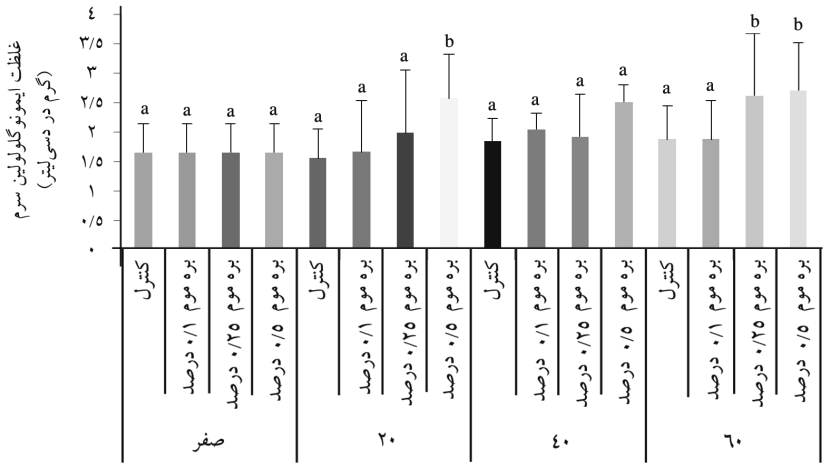
شکل ۳- نتایج مربوط به‌میزان قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم.

پروتئین تام سرم: مقایسه میزان پروتئین تام سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ درصد و کنترل در شکل ٤ آمده است. تغذیه ماهی کپور معمولی با عصاره الکلی ۰/۵ درصد وجود افزایش ظاهری میزان پروتئین سرم در هر سه مرحله نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در مورد تیمار تغذیه شده با عصاره الکلی ۰/۲۵ درصد در مرحله سوم نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. با این وجود مشاهده نکردن تفاوت معنی‌دار در تیمار تغذیه شده با عصاره الکلی ۰/۱ درصد با گروه کنترل در هر سه مرحله نمونه‌گیری مشاهده نگردیده است (P>۰/۰۵).



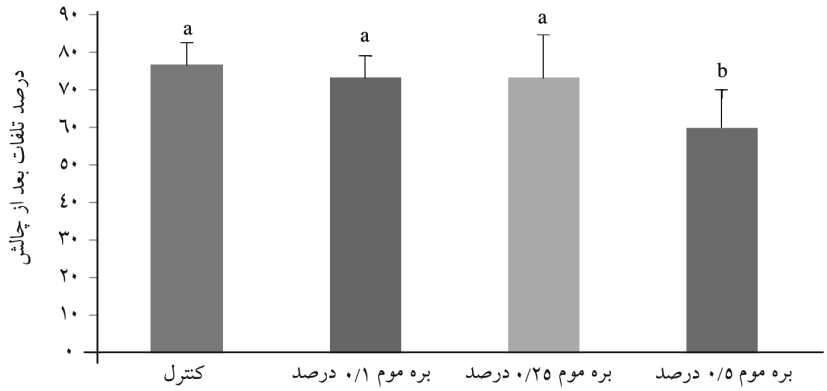
شکل ٤- نتایج مربوط به میزان پروتئین تام سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم.

گلوبولین سرم: مقایسه میزان گلوبولین سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ درصد و گروه کنترل در شکل ۵ آمده است. تیمار عصاره الکلی ۰/۵ درصد در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ پژوهش باعث افزایش معنی‌داری در گلوبولین سرم گردیده است (P<۰/۰۵). در مورد تیمار تغذیه شده با عصاره الکلی ۰/۲۵ درصد در مرحله سوم نمونه‌گیری تفاوت معنی‌داری مشاهده گردیده است. با این وجود مشاهده نکردن تفاوت معنی‌دار در تیمار تغذیه شده با عصاره الکلی ۰/۱ درصد با گروه کنترل در هر سه مرحله نمونه‌گیری مشاهده نشده است (P>۰/۰۵). بیش‌ترین تأثیر بر روی گلوبولین سرم در تیمار ۰/۵ درصد و کم‌ترین تأثیر در تیمار ۰/۱ درصد مشاهده گردیده است.



شکل ۵- نتایج مربوط به‌میزان گلوبولین سرم در تیمارهای عصاره الکلی بره موم.

رویارویی باکتریایی: نتایج مربوط به درصد تلفات تیمار (در تیمارهای عصاره الکلی بره موم در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ درصد و گروه کنترل) به‌مدت ۱۰ روز بعد از تست رویارویی باکتریایی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شکل ۶ آورده شده است. تیمار عصاره الکلی ۰/۵ درصد در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ پژوهش باعث کاهش معنی‌داری در میزان تلفات گردیده است (P<۰/۰۵). کم‌ترین میزان تلفات بعد از تست رویایی باکتریایی در تیمار ۰/۵ درصد و بیش‌ترین تلفات در تیمار ۰/۱، ۰/۲۵ درصد و گروه کنترل مشاهد گردید.



شکل ۶- نتایج مربوط به چالش تیمارهای با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تیمارهای عصاره الکلی بره موم.

بحث

ماهی‌ها بـه‌علـت قـرار گـرفتن در سـطوح پـایین تکاملی نسبت به حیوانات خـون‌گـرم، دارای سیسـتم ایمنی ساده‌تر و ابتدایی‌تـری هسـتند. بنـابراین ایمنـی اختصاصی در حیوانات خون‌سرد به‌ویژه ماهی‌ها کم‌تر توسعه‌یافته و بیش‌تر بازوی ایمنی غیراختصاصی وظیفه دفاعی را به عهده گرفتـه اسـت. ایـن وضـعیت ویـژه باعث اهمیت خاص محرک‌هـای ایمنـی (کـه باعـث تحریک ایمنی غیراختصاصی می‌گردند) در ماهی شده است. به‌طوری‌که حتی برای افزایش کارایی واکسن‌ها، باید در کنار استفاده از واکسن‌ها از محرک‌های ایمنـی غیراختصاصی نیز استفاده نمود (Iwama و Nakanishi ، ۱۹۹٦). نتایج پژوهش نشان داد کـه اسـتفاده از بـره موم عسل با غلظت ۰/۵ درصد میزان فعالیت لیـزوزیم سرم خـون را در روزهـای ۰، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ پـژوهش بـه‌طـور معنـی‌داری افـزایش داده اسـت. لایـزوزیم پروتئینی با ارزش در ماهی است که یکـی از اجـزای مهم ایمنی غیراختصاصی ماهی بوده و باعث تخریـب جدار باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری، به‌عنـوان اپسـونین (شـامل کمپلمـان و آنتی‌بـادی‌هـا)، در مـاهی مـی‌گـردد (Sakai، ۱۹۹۹). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجـویز محـرک‌هـای ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گـزارش گردیده است (Swain و همکـاران، ۲۰۰٦). همچنـین افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کاراس (Chen و همکـاران، ۲۰۰۳)، مـاهی Large yellow croaker (Jain و Wu، ۲۰۰۳) و ماهی کپـور معمـولی (Jain و Wu، ۲۰۰٤) بعد از تجویز جیره عصـاره‌هـای گیـاهی گزارش شده است. قدرت باکتری‌کشی سرم ماهی‌هـا تحت‌تأثیر تجویز جیره عصاره الکلـی بـره مـوم قـرار نگرفت. قدرت باکتری‌کشی سرم نشـان‌دهنـده ایمنـی هومـورال غیراختصاصـی مـاهی مـی‌باشـد و دفـاع غیراختصاصی سرم در برابر عفونت‌های باکتریـایی را نمایان می‌نماید، برخی گزارش‌ها بیانگر تأثیر نداشـتن افـزایش قـدرت بـاکتری‌کشـی سـرم بعـد از تجـویز محرک‌های ایمنی است. Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و Christybapita و همکاران (۲۰۰۷) به‌ترتیب در ماهی تیلاپیـا و قـزل‌آلای رنگـین‌کمـان (*Onchorhyncus mykiss*)، تـأثیر نداشـتن عصـاره گیـاه *Solanum trilobatum* در قدرت ضدباکتریایی سـرم را گـزارش نمودند، ولی برخی گزارش‌هـا بیـانگر تـأثیر افـزایش قدرت باکتری‌کشی سرم بعد از تجـویز محـرک‌هـای ایمنی است (Misra و همکـاران، ۲۰۰۹). نتـایج ایـن پژوهش با آن‌ها انطباق ندارد که علت را مـی‌تـوان بـه ویژگی‌های عصاره مورد اسـتفاده و نیـز گونـه مـاهی مورد بررسی نسبت داد. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) تجـویز عصـاره گیـاه آلوئـه‌ورا را در افـزایش قـدرت باکتری‌کشی سرم ماهی کپور معمـولی مـؤثر دانسـتند. البته در گزارش‌های دیگری در بـه‌کـارگیری از سـایر محرک‌های ایمنـی در مـاهی و بررسـی اثـر تحریـک ایمنی آن‌ها بر فعالیت آنزیم مورد نظر، افزایش نـدادن لیزوزیم گزارش شده است. Yin و همکـاران (۲۰۰٦) اثـر تجـویز جیـره عصـاره گیـاه *Radix scutellaria* به‌عنوان یک ماده محرک ایمنی را بر فعالیت آنـزیم در ماهی تیلاپیا بررسی و گزارش کردند که ایـن فـاکتور تغییری پیدا نکرده است. میزان گلوبولین سـرم تقریبـاً در تمام تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌هـای مختلـف عصاره الکلی بره موم افزایش نسـبی را نشـان داد کـه این افزایش در تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). گزارش‌های متعددی از افـزایش گلوبولین سرم به دنبال استفاده از محرک‌هـای ایمنـی گیاهی وجود دارد. سطح پروتئین تام سرم نیز افزایش نسبی به دنبال تجویز عصاره الکلی بره موم نشـان داد. هر چند این افزایش فقط در تیمار ۰/۵ درصد از نظـر آماری معنی‌دار بـود. سـطح پـروتئین سـرم شـاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنـی و سـلامت

ماهی می‌باشند (Siwicki و همکاران، ۱۹۹٤). بر خلاف تأثیر تجویز جیره بره موم بر گلوبولین و پروتئین تام سرم، این ماده بر آلبومین سرم تأثیر معنی‌داری در هیچ‌کدام از مراحل نمونه‌گیری نداشت. از آن‌جا که آلبومین یک پروتئین غیرایمنی در سرم بوده و نقش چندانی در واکنش‌های دفاعی ماهی ندارد منطقی به‌نظر می‌رسد که از تجویز محرک‌های ایمنی تأثیر نپذیرد. تلفات بعد از تست رویارویی باکتریایی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا نیز در تیمار ۰/۵ درصد عصاره الکلی بره موم کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ولی در تیمار ۰/۲۵ و ۰/۱ درصد تلفات معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). یکی از ویژگی‌های اصلی محرک‌های ایمنی افزایش بقای ماهی‌ها پس از چالش با باکتری‌های زنده و پرحدت می‌باشد (Gudmundsdóttir و Magnadóttir، ۱۹۹۷). نتایج مشابهی از کاربرد، پودر برگ گیاه *Rosmarinus officinalis* (Abutbul و همکاران، ۲۰۰٤)، عصاره آبی گیاه *Eclipta alba* (Christybapita و همکاران، ۲۰۰۷) و عصاره الکلی گیاه *Solanum trilobatum* (Christybapita و همکاران، ۲۰۰۷) نیز در منابع مشاهده گردید که به‌نسبت با یافته‌های این پژوهش انطباق دارد.

به‌عنوان نتیجه کلی می‌توان گفت که عصاره الکلی بره موم بیش‌تر فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی را تحت‌تأثیر قرار داده و می‌توان از آن به‌عنوان کاندیدایی برای تحریک ایمنی غیراختصاصی ماهی بهره جست.

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس فراوان از دوست ارجمندم مهندس پرسام علیزاده که صمیمانه مرا یاری رساند، سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

۱- علیشاهی، م.، ۱۳۸۳. نقش محرک‌های ایمنی در آبزی‌پروری، مجله سازمان نظام دامپزشکی کشور، سال چهارم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۳، ص ۳۸-۳۳.

2.Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., and Zilberg, D., 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). Aquaculture. 238, 97-105.

3.Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., and Razi Jalali, M., 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. 4 (3), 85-91.

4.Azza, M., and Abd-El-Rhman, M., 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by Propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fish & Shellfish Immunology, 27, 454-459.

5.Bagenal, T., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. Blackwall scientific pub. Oxf. London. 365p.

6.Beyraghdar Kashkooli, E., Dorcheh, E., Mahboobi-Soofiani, N., and Samie, A.H., 2011. Long-term effects of Propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 315-318.

7.Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein. Annalytical Biochemistry, 72, 248-254.

8.Chen, X., Wu, Z., Yin, Z., and Li, L., 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. J. Fish Sci. China. 10, 36-40.

9.Christybapita, D.M., Divyagnaneswari, and Dinakaran Michael, R., 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish and Shellfish Immunology, 23, 840-852.

10.Cuesta, A., Rodr, A., Esteban, M.A., and Meseguer, J., 2005. In vivo effects of Propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. Fish Shellfish Immunol. 18, 71-80.
11.Deng, J., An, Q., Bi, B., Wang, Q., Kong, L., Tao, L., and Zhang, X., 2011. Effect of ethanol extract of Propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. pp. 1-9.
12.Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assay. In: Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S., and Robertson, B.S. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, Fair Haven, NJ, pp. 101-103.
13.Fernandes, F.F., Dias, A.L., Ramos, C.L., Ikegaki, M., de Siqueira, A.M., and Franco, M.C., The in vitro antifungal activity evaluation of Propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2007, 49 (2), 93-5.
14.Gudmundsdóttir, B.K., and Magnadóttir, B., 1997. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida achromogenes*. Fish and Shellfish Immunology. 7, 55-69.
15.Iwama, G., and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish, pp. 73-114.
16.Jain, J., and Wu, Z., 2003. Effect of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker *Psedcosciaena crocea* (Richardson) Aquaculture, 218, 1-9.
17.Jain, J., and Wu, Z., 2004. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish and Shellfish Immunology. 16, 185-191.
18.Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., and Kobayash, M., 1990. The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology. 25, 93-98.
19.Kirpichnikov, V.S., 1972. Methods and effectiveness of Rop-sha carp breeding. Immunication I. Breeding Aims, Orginal Forms and Cross System, Rus. J. Gen. 8 (1), 65-72.
20.Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
21.Misra, C.K., Das, B.K., and Mukherjee, S.C., 2009. Immune response, growth and survival of *Labeorohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. Aquaculture Nutrition, 15, 356-365.
22.Obach, A., Quentel, C., and Bandin, L.F., 1993. Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis. Aquat. Org. 15, 175-185.
23.Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172, 63-92.
24.Schaperclaus, W., Kulow, H., and Schreckenbach, K., 1991. Hematological and serological technique. In: Kothekar VS, editor. Fish disease. 2nd ed. vol. 1. N, 56 Connaught circus, New Delhi: Gulab primlani, Oxonian press Pvt. Ltd. pp. 71-108.
25.Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology munopathology, 41, 125-139.
26.Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P., Sahoo, S.K., Gupta, S.D., Meher, P.K., and Sarangi, N., 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeorohita* and their seasonal variations. Fish & Shellfish Immunology, 22, 38-43.
27.Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., and Bruni, A., 1996. Antimicrobial activity of some commercial extracts of Propolis prepared with different solvents. Phytother Res. 10 (4), 335-6.
28.Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X., and Jeney, Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 253, 39-47.

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 7, No. 4, January 2014

Effects of dietary ethanolic Extract of Propolis, a honeybee product, on immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*)

***S. Valipour[1], M. Mesbah[2], M. Javaheri Baboli[3] and M. Alishahi[4]**
[1]M.Sc. Student, Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Khoozestan, Ahvaz, Iran, [2]Associate Prof., Dept. of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, [3]Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Agricultural, Islamic Azad University, Ahvaz Branch, Ahvaz, Iran, [4]Associate Prof., Dept. of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

In this study, the effects of bee Propolis extract on humoral immune response of common carp *Cyprinus carpio* were investigated. For this purpose, the 300 common carp fingerlings (intial weight 50±10 g) were divided into four groups and fed with a control diet and a diet containing. 0.1%, 0.25%, 0.5% ethanol extract of Propolis for 60 days. The blood samples were provided on days 0, 20, 40 and 60 and Lysozyme activity, bactericidal activity, total protein, albumin and globulin were measured. At the end of the trial fingerlings were exposed to the bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila* and mortality was recorded for 10 days. The results indicate that the diet 0.5% ethanol extract of Propolis increased significantly lysozyme activity in total protein, globulin ($P<0.05$). Bacterium *Aeromonas hydrophila* mortality after bacterial encounter test also treated 0.5% Propolis extract showed a significant decreasing compared to control while mortality in 0.25% and 0.1% was not significant ($P>0.05$). The results of this experiment suggest that suitable concentrations of Propolis extract in the diet to stimulate humoral immunity and increased resistance to testing encounter bacterial is concentration of 0.5%.

Keywords: *Cyprinus carpio*; Propolis; Immune response; Challenge

* Corresponding Authors; Email: valypour_s5742@yahoo.com