مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۵، ۳۴۳ - ۳۳۷

تاثیر سطوح مختلف اسید اسکوربیک بر برخی از شاخص‌های ایمنی فیل ماهیان جوان

بهرام فلاحت‌کار[۱] مهدی سلطانی[۲]* مجتبی علیشاهی[۳] اشکان زرگر[۴]

۱) گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، صومعه سرا - ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران.
۳) بخش بیماری های دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران، اهواز - ایران.
۴) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۲ آذر ماه ۱۳۸۵ ، پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۶)

چکیده

تاثیر سطوح مختلف اسید اسکوربیک شامل مقادیر صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم غذا بر میزان فعالیت لایزوزیم خون، میزان آنتی بادی، جمعیت لکوسیتی و بقا فیل ماهیان جوان ۳۸ گرمی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ هفته مورد مطالعه قرار گرفت. هشت هفته پس از اضافه کردن ویتامین C به جیره ماهیان، اختلاف معنی داری در میزان لایزوزیم در تیمارهای ۴۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در کیلو غذا با گروه کنترل (شاهد) مشاهده شد ($p<0/50$). در هفته شانزدهم پس از شروع آزمایش، میزان لایزوزیم در گروه‌های مختلف نیز بالاتر از گروه کنترل بود اما نسبت به همدیگر فاقد اختلاف معنی‌داری بود ($p>0/50$). بیشترین جمعیت لکوسیتی در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در کیلو غذا مشاهده شد. حداکثر میزان عیار آنتی بادی در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین C مشاهده ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود ($p>0/05$). هیچ‌گونه تلفاتی در تیمارهای در معرض قرار داده‌شده با سویه حاد آئرومونا هایدروفیلا مشاهده نشد در حالی‌که در گروه کنترل ۲۹/۹ درصد تلفات اتفاق افتاد. این مطالعه نشان می‌دهد که علی‌رغم توانایی این ماهی به سنتز این ویتامین، افزودن آن به غذا در مراحل بچه ماهی موجب ارتقای برخی از واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی (لایزوزیم، جمعیت لکوسیتی) و اختصاص (تولید آنتی‌بادی) و نیز درصد بقای آن در مواجهه با سپتی‌سمی آئرومونا س می‌شود. لذا استفاده از این ویتامین در سنین پایین‌تر می‌تواند موجب تقویت واکنش‌های دفاعی و در نتیجه افزایش مقاومت به عفونت‌های باکتریایی در مراحل اولیه ابتدایی رشد و نمو ماهی که از حساسیت بیشتری به عوامل بیماری‌زا و شرایط نامساعد زیست محیطی و پرورشی برخوردار است شود.

واژه‌های کلیدی: اسید اسکوربیک (ویتامین C)، فیل ماهی، آئرومونا س هایدرو فیلا، لایزوزیم.

مقدمه

از دهه ۱۹۸۰ که توجه برخی کشورها به پرورش ماهیان خاویاری معطوف گردید(۳) مطالعاتی نیز در مورد نیازهای تغذیه‌ای انجام شد. با توجه به این‌که اشراف به بیوتکنیک و پرورش گونه پرورشی منجر به موفقیت در آبزی پروری است اما علی‌رغم پیشرفت‌های خوبی که طی چند سال اخیر در مورد پرورش تاس ماهیان صورت گرفته است لیکن اطلاعات کافی در مورد نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها وجود ندارد(۱۳). راسته ماهیان خاویاری (Acipenseriformes) جزء آبزیان قدیمی با قدمت ۲۰۰ میلیون سال شامل ۲۷ گونه و بسیار با ارزش بوده که امروزه نسل بسیاری از آن‌ها به دلایلی چند منجمله صید بی‌رویه، آلودگی‌های زیست محیطی و از بین رفتن مناطق مناسب تخم‌ریزی در خطر بوده و بسیاری از آن‌ها براساس IUCN در معرض خطر انقراض قرار دارند. بدین سبب توجه بسیاری از دولت‌ها و سازمان‌های مختلف به امر حفاظت و حراست از این‌گونه‌های ارزشمند معطوف گشته و توجه ویژه‌ای به امر تکثیر و پرورش آن‌ها و درک نکات گوناگون در این مقوله شده است. در حال حاضر برخی از کشورهای جهان به پرورش ماهیان خاویاری به عنوان یک گونه جدید جهت عرضه به بازار پرداخته به طوری‌که طبق آخرین آمارها، میزان پرورش این ماهیان به ۱۹۶۴۸ تن در سال ۲۰۰۵ رسیده است (۹).

ویتامین C یا اسید اسکوبیک یکی از ویتامین‌های گروه محلول در آب بوده که دارای نقش‌های متابولیک متعددی از جمله اثر بر رشد، بازماندگی بیشتر و جلوگیری از مرگ‌ومیر، بهبود زخم‌ها، کاهش اثرات استرس ومقاومت در برابر عوامل پاتوژن و بهبود عملکرد تولید مثل می‌باشد (۴،۱۸،۳۰). این ویتامین ماده‌ای ضروری برای جانوران آبزی محسوب می‌گردد چرا که اغلب آن‌ها قادر به سنتز آن نبوده و جهت تامین آن کاملا وابسته به منابع خارجی غذا می‌باشند. این ویتامین به عنوان یک کو - فاکتور در واکنش‌های هیدروکسیلاسیون عمل نموده و یک ماده کاهش دهنده بیولوژیک قوی در بافت‌ها و سلول‌ها محسوب می‌گردد. مدارک آزمایشگاهی مستند نشان می‌دهند که ویتامین در چندین روند شامل رشد، تولید مثل، پاسخ به عوامل استرس‌زا، بهبود زخم و پاسخ ایمنی درگیر می‌باشد. مقدار نیاز ماهیان سرد آبی و سایر ماهیان طی چند سال اخیر مشخص شده است و این امر منجر به حذف علایم کلینیکی کمبود این ماده در مزارع پرورشی گشته است(۳۰). لذا با توجه به اثرات بسیار گوناگون و متنوع اسید اسکوربیک بر فیزیولوژی به ویژه سیستم ایمنی بدن، درک برخی از این اثرات بر روی گونه فیل ماهی و ایجاد ارتباط منطقی بین این تغییرات و سطوح متفاوت آن در جیره می‌تواند در بسیاری از مراحل پرورش این گونه که در بین گونه‌های ماهیان خاویاری دارای سریع ترین رشد بوده و گونه مناسبی جهت پرورش محسوب می‌گردد کمک شایان توجهی نماید. بدین سبب این

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: msoltani@ut.ac.ir

مطالعه با هدف ارزیابی اثرات سطوح مختلف این ویتامین بر سطوح فعالیت لایزوزیم در طول دوره پرورش، مقاومت به بیماری، عیار آنتی بادی و جمعیت لکوسیتی پس از آلوده سازی ماهیان با باکتری آئروموناس هایدرو فیلا انجام پذیرفت. اهمیت مطالعه از آن جهت قابل توجه است که ماهیان خاویاری قادر به سنتز این ویتامین می‌باشند اما این‌که آیا مقادیر سنتز شده توسط ماهی در دوران اولیه برای ایجاد مقاومت لازم در برابر عفونت‌های شایع کافی است یا خیر موضوع و سؤال این تحقیق است.

مواد و روش کار

۱- ماهی: از تعداد ۹۹۰ بچه فیل ماهی با میانگین وزنی ۳۸ گرم حاصل تلاقی یک مولد ماده و یک مولد نر در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی (سد سنگر) استفاده شد. ماهیان در ۵ تیمار و یک گروه کنترل و هر تیمار در سه تکرار حاوی ۵۵ ماهی داخل تانک‌های ۲۰۰۰ لیتری نگهداری و به مدت ۲ هفته سازگاری داده شدند.

۲- غذادهی: در طول دوره آزمایش از یک نوع جیره غذایی استفاده شد. به جیره غذایی ماهیان، ویتامین C در شکل اسکوربیک (ال اسکوربیل - ۲- پلی فسفات ;F.Hoffman La Roche) با مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم غذا اضافه و ماهیان برای یک دوره ۱۶ هفته‌ای با این جیره‌ها تغذیه شدند، گروه کنترل در سه تکرار با جیره مشابه ولی فاقد ویتامین C نیز در نظر گرفته شد.

۳- فاکتورهای کیفی آب: فاکتورهای کیفی آب در طی دوره آزمایش با استفاده از آب رودخانه با مشخصات دمای ۳/۸±۲۰ درجه سانتیگراد، اکسیژن ۰/۵±۶/۸۵ mg/l و pH برابر ۷/۷۵ بود.

۴- سنجش میزان لایزوزیم: برای انجام این کار از هر تکرار ۶ ماهی به طور تصادفی انتخاب (هر تیمار ۱۸ ماهی) و پس از بیهوشی با اسانس گل میخک، از ورید ساقه دمی آن‌ها خون‌گیری، پس از جداسازی سرم‌ها تا انجام آزمایش به ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. میزان فعالیت لایزوزیم سرم در هفته‌های ۸ و ۱۶ پس از شروع آزمایش با استفاده از روش کدورت سنجی و به روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) اندازه‌گیری گردید. به طور خلاصه، ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (۰/۳۷۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار pH:۶/۲) با ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۳ دقیقه به روش طیف سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک (Blank) و مقادیر مشخص از لایزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان استاندارد در نظر گرفته شدند. فعالیت لایزوزیم براساس میزان کاهش جذب نوری اندازه‌گیری شد.

۵- جمعیت لکوسیتی: برای تعیین جمعیت لکوسیتی (تعداد گلبول‌های سفید) از روش توصیه شده توسط Klontz در سال ۱۹۹۴ (۱۵) استفاده شد به طوری‌که در زمان خون‌گیری (هفته‌های ۸ و ۱۶) مقدار خون به لوله‌های هپارینه منتقل و سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر خون هپارینه با ۴۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده مخلوط و با استفاده از لام هموسایتومتر عمل شمارش صورت گرفت. از هر تکرار ۶ نمونه (هر تیمار ۱۸ نمونه) استفاده گردید.

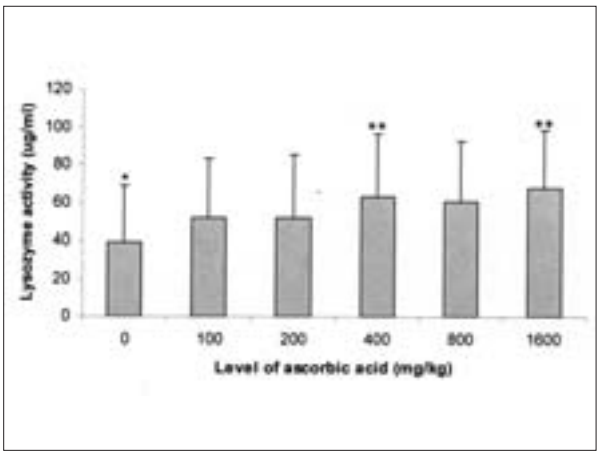
۶- تعیین درصد بقا پس از در معرض قرارگیری با آئروموناس هایدرو فیلا: در پایان هفته ۱۶ نسبت به قطع ویتامین C در جیره اقدام و ماهیان با سویه حاد آئروموناس هایدرو فیلا (Soltani,Kalbassi ,200) (۳۳) به صورت حمام و با غلظت ۲۲×۱۰^{۶} سلول باکتری به ازای هر میلی لیتر آب به مدت ۳۰ دقیقه در تانک‌های ۵۰۰ لیتری حمام داده شدند. سپس تلفات روزانه به مدت ۱۰ روز ثبت گردید.

۷- سنجش عیار آنتی بادی: در پایان روز دهم پس از در معرض قرارگیری با آئروموناس هایدرو فیلا از هر تکرار (ماهیان باقی مانده) تعداد ۶ ماهی خون‌گیری و پس از جداسازی سرم‌ها برای آزمایش تیتر آنتی بادی به روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی توصیه شده توسط Robertson در سال ۱۹۹۰ (۲۹) استفاده گردیدند. ابتدا میزان ۲۵ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به گوده‌های پلیت الایزا (به جز گروه اول) اضافه گردیده و سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم رقیق نشده (با انجام آزمایشات اولیه مشخص شد که نیاز به رقیق سازی سرم نمی‌باشد) در اولین و دومین گوده ریخته شد. رقت‌های بر مبنای دو در گوده‌های ۲ الی ۱۲ تهیه و ۲۵ میکرولیتر از گوده ۱۲ حذف گردید. مقدار ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی آئروموناس هایدرو فیلا تهیه شده در بافر فسفات سدیم (با رقت مک فارلین شماره ۳=۹×۱۰^{۸} cells/ml) به تمام گودها اضافه شده و نتایج پس از یک شب نگهداری پلیت در دمای اتاق قرائت گردید به طوری که آخرین گوده‌ای (بالاترین رقتی) که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته به عنوان تیتر آنتی بادی نمونه سرم گرفته شد. سرم گروه کنترل به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و تمام نمونه‌ها در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

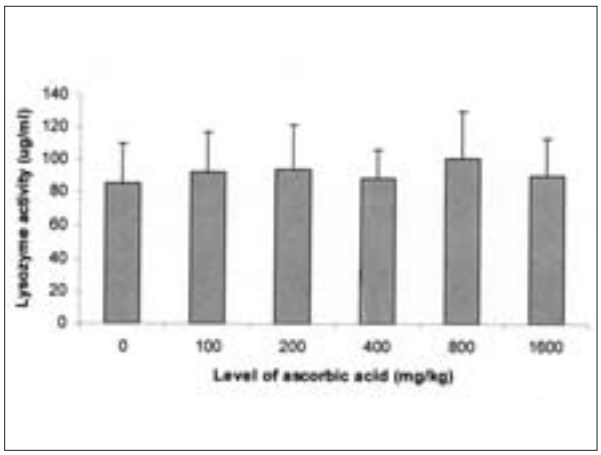
آنالیز آماری: طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی (Completely Randomized Design) برنامه ریزی و اجرا گردید. کلیه داده‌های جمع آوری شده در هر مرحله در نرم افزار Excel ثبت و داده‌ها پس از کنترل همگنی آن‌ها به وسیله Kolmogornov-Smirnov، و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست LSD به عنوان Hos Post جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در خصوص تیتر آنتی بادی، داده‌های جمع آوری شده، قبل و بعد از تست مزبور با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد پردازش آماری قرار گرفت. اختلاف میانگین‌ها در کلیه موارد در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $p<۰/۰۵$ تعیین گردید. تجزیه و تحلیل کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS انجام پذیرفت (SPSS12.0, Chicago, IL).

نتایج

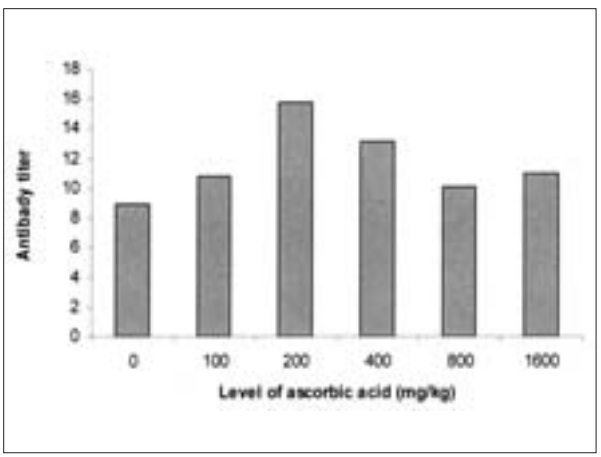
۱- سنجش لایزوزیم: نتایج سنجش لایزوزیم سرم در هفته‌های هشتم و شانزدهم در نمودار ۱ نشان داده شده است. براین اساس، حداقل میزان لایزوزیم اندازه‌گیری شده در هفته هشتم (نمودار ۱-۱) در تیمار صفر با



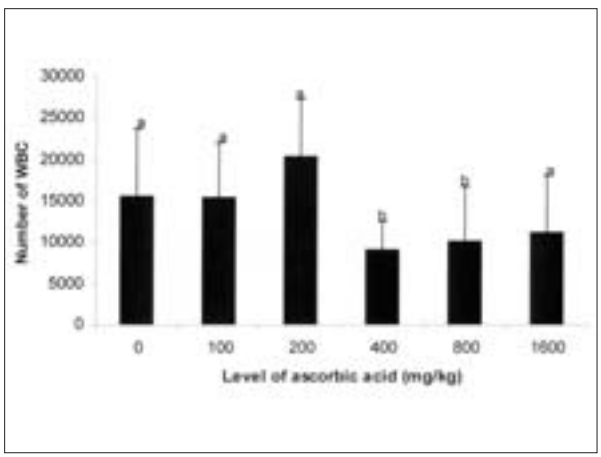
نمودار۱-۱- پس از هشت هفته.



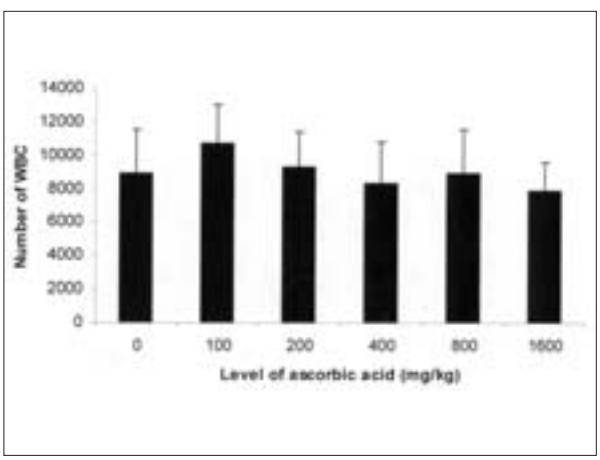
نمودار۲-۱- پس از شانزده هفته .



نمودار۲-



نمودار۲-۳-



نمودار۱-۳. پس از هشت هفته.

۲۹/۶±۳۹/۳ و حداکثر آن در تیمار ۱۶۰۰mg/kg به میزان ۳۰/۵±۶۷/۶μg/ml مشاهده گردید. آنالیز آماری نشان می‌دهد در تیمار صفر اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۴۰۰ و ۱۶۰۰mg/kg ملاحظه می‌گردد($p<۰/۰۵$). با توجه به اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم در هفته شانزدهم، (نمودار۱-۲) حداقل آن در تیمار صفر با ۲۴/۷±۸۵/۶ و حداکثر آن در تیمار ۸۰۰mg/kg به میزان ۲۸/۴μg/ml±۱۰۱/۲ گردید اما آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای مختلف نشان نداد($p>۰/۰۵$).

نمودار۱- میزان فعالیت لایزوزیم موجود در سرم خون فیل ماهیان جوان پرورشی هشت(نمودار۱-۱) و شانزده (نمودار۲-۱) هفته پس از تغذیه با مقادیر ویتامین C (میانگین ± انحراف معیار، n=۱۸ عدم وجود حروف در ستون‌ها نشان دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در پارامتر مذکور می‌باشد).

۲- تیتر آنتی بادی: نتایج مربوط به تیتر آنتی بادی در نمودار ۲ آمده است. بر اساس نتایج مذکور حداقل تیتر آنتی بادی در گروه شاهد (۸/۹۴) و حداکثر آن در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین C (۱۵/۷۷) مشاهده گردید. هیچگونه اختلاف معنی‌داری در میزان تیتر آنتی بادی در میان تیمارهای مختلف مشاهده نگردید($p>۰/۰۵$).

نمودار ۲- تیتر آنتی بادی فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف ویتلمین C به مدت ۱۶ هفته و سپس در معرض قرار داده شده با

آئروموناس هایدرو فیلا(میانگین±انحراف معیار،n=۱۸). عدم وجود حروف در ستون‌ها نشان دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در پارامتر مذکور می‌باشد.

۳-جمعیت لکوسیتی(WBC): نتایج جمعیت لکوسیتی در نمودار ۳ نشان داده شده است. براین اساس، حداکثر و حداقل جمعیت لکوسیتی در هفته ۸ و پس از شروع آزمایش به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C مشاهده شد. بهرحال اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و نیز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد($p>۰/۰۵$). به علاوه حداقل و حداکثر جمعیت لکوسیتی درهفته ۱۶ در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C مشاهده گردید($p<۰/۰۵$).

نمودار۳- جمعیت لکوسیتی فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C پس از ۸ هفته(نمودار۱-۳) و ۱۶ هفته (نمودار۲-۳) هفته و سپس در معرض قرار داده شده با آئروموناس هایدرو فیلا(میانگین ± انحراف معیار،n=۹). عدم وجود حروف در ستون‌ها نشان دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در گروه‌های مذکور می‌باشد.

درصد بقا: تا ۱۰ روز پس از حمام باکتریایی هیچگونه تلفاتی در گروه‌های تیمار رخ نداد در حالی که در گروه کنترل ۲۹/۹درصد تلفات (۱۵ ماهی) تلف شدند که نتایج کشت باکتریایی مبتلا به سپتی سمی آئروموناس بودند.

بحث

با توجه به نتایج کسب شده در مطالعه حاضر مشخص گردید که مقدار فعالیت لایزوزیم تحت تاثیر مقادیر مختلف ویتامین C بوده و این مورد خصوصا در هفته هشتم ملموس و دارای اثر معنی‌داری می‌باشد به طوری که این مقدار از حداقل۳۹/۳±۲۹/۶μg/ml در دوز صفر به حداکثر ۶۷/۶±۳۰/۵μg/ml در دوز ۱۶۰۰ mg/kg رسید. همچنین در مقادیر مصرفی ویتامین C، اثر این ماده غذایی بر افزایش فعالیت آنزیم مشخص می‌باشد چرا که در هفته شانزدهم نیز علاوه بر هفته هشتم شاهد یک روند افزایش در مقدار لایزوزیم از مقدار۸۵/۶±۲۴/۷μg/ml در دوز صفر تا مقدار۱۰۱/۲±۲۸/۴μg/ml در دوز ۸۰۰mg/kg می‌باشیم. لذا اثر این ویتامین خصوصا بر روی مقدار فعالیت لایزوزیم در ارتباط با مقدار مصرف در جیره در مراحل ابتدایی رشد کاملا ملموس بوده و همچنین این امر با مقدار افزایش نوتروفیل‌های موجود در خون نیز هم‌خوانی دارد زیرا لکوسیت‌ها از منابع اصلی تولید لایزوزیم هستند.

Verlhac و همکاران در سال۱۹۹۸(۳۳) مقدار فعالیت لایزوزیم را با مصرف ویتامین C در ماهی مرتبط دانستند(۳۳). در ارتباط با لایزوزیم، برخی مطالعات نشان داده است که ویتامین C بر این ماده اثرگذار است(۵) در حالی که سایرین این رابطه را نشان نداده‌اند(۳۲). Sandens و همکاران در سال ۱۹۹۰ (۳۲) نیز اثر معنی‌داری را در تولید آنتی بادی علیه انتی ژن در ماهیان تغذیه شده با مقادیر ۵۰۰ و۵۰۰۰mg/kg ویتامین C مشاهده ننمودند(۳۱). در تحقیقی که توسط Ai و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۱) انجام شد مشخص گردید فعالیت لایزوزیم و عامل مکمل در سرم، با افزایش اسید اسکوربیک جیره در ماهی باس دریایی ژاپنی(Lateoabrax Japonicus) افزایش یافته و وقتی که مقدار اسکوربیک اسید جیره به ۴۸۹mg/kg می‌رسد این پارامترها نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهند(۱). با توجه به نتایج مطالعات مذکور مشخص است که همانند جانوران خون گرم، ویتامین C در ارتقاء برخی واکنش‌های دفاعی و ایمنی بچه ماهیان به ویژه در تمایز و تکثیر سلول‌های خونی موثر است.

Jeney و Jeney در سال ۲۰۰۲(۱۴) با بررسی اثر دوزهای مختلف ویتامین C در تاس ماهی هیبرید (A .ruthenus × A baeri) با وزن متوسط ۱۲g -۱۰و دمای ۲۳-۲۲ سانتیگراد به این نتیجه رسیدند که میان فعالیت لایزوزیم در ماهیان تغذیه شده با سطوح ۱۰۰ و ۱۰۰۰mg/kg ویتامین C به مقدار ۱۰/۸۹±۲/۰۵ و ۱۱/۲۴±۲/۳۳μg/ml بوده که با دوزهای ۱۰ و صفرکه به ترتیب ۱/۴±۰/۶و ۱/۳±۰/۲μg/ml بودند اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. به همین دلیل آن‌ها پیشنهاد نمودند که تجویز این ویتامین از طرق غذای دستی ممکن است برخی اثرات مثبت را در مراحل اولیه رشد ماهیان خاویاری به وجود آورد (۱۴). نتایج این مطالعات همچنین نشان داد که تجویز ویتامین C در مراحل بچه ماهی فیل ماهیان موجب کمک به تولید آنتی بادی در برابر آنتی ژن‌های باکتری آئروموناس می‌شود زیرا تیتر آنتی بادی در گروه‌های تیمار بیشتر از کنترل بود. به علاوه افزایش تیتر آنتی بادی همراه افزایش جمعیت لکوسیتی و افزایش بقای گروه‌های تیمار بیانگر تاثیر مثبت استفاده از ویتامین C در مرحله بچه ماهی می‌باشد.

بیشتر مطالعات نشان می‌دهند که در صورت فقدان ویتامین C در غذا، حساسیت ماهی به عفونت‌های باکتریایی بیشتر می‌گردد اما تناقضاتی نیز در این زمینه وجود دارد. Li و Lovell در سال ۱۹۸۵ (۱۸)، متوجه شدند در گربه ماهیانی که به وسیله جیره‌های با کمبود ویتامین C تغذیه شده بودند تولید آنتی بادی، فعالیت فاگوسیتیک ماکروفاژها و فعالیت عامل مکمل کاهش یافت. بنابراین این ویتامین هم بر پاسخ ایمنی سلولی و هم ایمنی مایعی تاثیرگذار است (۱۷). مطالعات متعدد در مورد گربه ماهی نشان می‌دهد که با کمبود ویتامین C تلفات بیشتری بر اثر عفونت با ادواردزیلا ایکتالوری مشاهده می‌شود(۶،۱۷،۱۸). در مطالعه مقدار ۳۰۰۰۰-۱۰۰۰mg/kg ویتامین C تلفات گربه ماهی را کاهش داد(۱۷،۱۹). در حالی که در مطالعه دیگر دوزهای ۵۰-۲۵mg/kg تاثیر بیشتری نسبت به دوزهای بالاتر داشت(۱۵،۱۶).

مطالعات انجام شده بر روی قزل‌آلای رنگین کمان و ماهی آزاد نشان داد که تغذیه با سطوح بالاتر ویتامین C نسبت به سطوح مورد نیاز جهت رشد نرمال، پاسخ‌های غیراختصاصی ایمنی را افزایش می‌دهد. Durve و Lovell در سال ۱۹۸۲ (۷) نشان دادند که تحت شرایط آزمایشگاهی و دمای ۳۲ درجه سانتیگراد هنگامی که گربه ماهیان با سطح ۳۰mg/kg ویتامین C تغذیه شده بودند دارای رشد مناسبی بوده و علایم کمبود در آن‌ها مشاهده نشده و بقایای خوبی در هنگام عفونت سپتی سمی ادواردزیلایی با عامل ادواردزیلا تاردا از خود نشان دادند. این در حالی بود که وقتی دمای آب به ۲۳ درجه سانتیگراد

کاهش یافت سطح مورد نیاز ویتامین به ۵ برابر افزایش پیدا کرد. لذا نویسندگان مقاله مذکور به این نتیجه رسیدند که به احتمال بسیار زیاد میزان نیاز به ویتامین C در دماهای پایین تر افزایش می یابد چرا که مقاومت طبیعی ماهی کاهش می یابد. زیرا در درجه حرارت پایین نیاز ماهیان به برخی عوامل از جمله اسیدهای چرب غیر اشباع و ویتامین‌های E و C برای تکثیر لنفوسیت‌های T که عامل محرک و تمایز لنفوسیت‌های تولید کننده آنتی بادی هستند بیشتر می‌شود زیرا دمای پایین مانع تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها می‌گردد(۷). مقدار بالای ویتامین C در برخی گونه‌ها نظیر قزل‌آلای رنگین کمان(۲۶)، ماهی آزاد آتلانتیک(۳۴)، به بهبود مقاومت به بیماری موثر است اما برخی مطالعات این نظریه را تایید می‌نمایند (۱۱،۲۷،۲۸). آلوده کردن ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین C با ویبریو آنگویلاروم به دو طریق غوطه‌وری و تزریق نشان داد مقاومت ماهی در مقابل بیماری با افزایش مصرف ویتامین C افزایش می یابد(۲۶) و Verlhac همکاران در سال ۱۹۹۸ (۳۵) نیز نشان دادند بیشترین میزان مقاومت ماهی قزل‌آلا به عفونت سپتی سمی ویروسی در ماهیان تغذیه شده با بالاترین سطوح ویتامین‌های C و E مشاهده شد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص گردید استفاده از این ویتامین در فیل ماهیان جوان که از نظر فیلوژنی قادر به سنتز ویتامین C می‌باشند(۲۵-۲۲) در شرایط پرورشی به سبب وجود بسیاری از پارامترهای نامساعد زیست محیطی، عوامل بیماری‌زا و شرایط استرس‌زا، استفاده از این ویتامین در جیره می‌تواند بر برخی شاخص‌ها نظیر لایزوزیم و پاسخ ایمنی تاثیر داشته باشد که به نظر می‌رسد اثر این ماده خصوصا در سنین پایین تر که ماهی به عوامل نا مطلوب در محیط پرورش حساسیت بیشتری دارد بالاتر بوده و سطح ۲۰۰mg/kg در شرایط وزنی و پرورشی مذکور قابل توصیه در جیره غذایی این ماهی است.

تشکر و قدردانی

لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاران محترم در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به سبب همکاری و حسن توجه در طول این پروژه تحقیقاتی اعلام داریم. از دانشگاه تهران و مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی که طی پروژه‌ای مشترک حمایت مالی این تحقیق را انجام دادند نیز سپاسگزاری می نماییم.

References

1. Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., and Liufu, Z. (2004) Efects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, Lateolabrax japonicus. Aquaculture. 242: 489-500.
2. Blaxhall, P. C., Daisley, K. W. (1973) Roution haematological methods for use with fish blood. J. Fish Bioi. 5: 771-781.
3. Bronzi, P., Rosenthal, H., Arlati, G., Williot, P. (1999) A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe. Journal of Applied Ichthyology. 15:224-227.
4. Dabrowski, K. (2001) Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC press. Boca Raton, pp.288.
5. Dabrowski, K., Mathusiewiez, K., Mathusiewicz, M., Hoppe, P. P., Ebeling, J. (1996) Bioavailability of vitamin C from two ascorbyl monophosphate esters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). Aquacult. Nutr. 2: 3-10
6. Duncan, P. L., Lovell, R. T. (1994) Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, lctalurus punctatus, for growth, hematopoiesis, and resistance to Edwardsiella ictaluri infection. Aquaculture. 127: 233-244.
7. Durve, V. S., Lovell, R. T. (1982) Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can. 1. Fish. Aquat. Sci. 39: 948-951.
8. Ellis, A. E. (1990) Lysozyme assays. In; J. S. Stolen, T. C., Fletcher, D. P., Anderson, Roberson, W. B. van Muiswinkel (Eds.), Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, USA, 1: 101-103.
9. FAO. (2006) FAO statistical yearbook of fisheries. FAO, Rome.
10. Floyd, R. (1987) Field efficacy of vitamin C prevention of enteric septicemia of cannel catfish. Proceedings of international Association of Aquatic Animal Medicine. 18: 181-183.
11. Hardie, L. J., Fletcher, T. C., Secombes, C. 1. (1991) The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salrno salar L.*). Aquaculture. 95: 201-214.
12. Hosokawa, H., Teishima, H., Shimeno, S., Takeda, M. (1990) Effect of dietary vitamin C for intensification of immunity on yellowtail. Japanese

Society of Fisheries Meeting, October, 1990. Abstract No. 437.

13. Hung, S. S. O., Deng, D. F. (2002) Sturgeon, Acipenser spp, In: Webster, C. D., Lim, C., (Eds.), Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI publishing,UK. pp.344-357.
14. Jeney, G., Jeney, Z. (2002) Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in sturgeon hybrid: Acipenser ruthfmus x A. baerii. J. Applied Ichthyology. 18: 416-419.
15. Klontz, G. W. (1994) Fish Haematology. In: Stolen, J. S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaattari, S.L. and Smith, S.A. (Eds) Techniques in Fish Immunology, SOS Publication,UK. 3: 121-132.
16. Li, M. H., Johnson, M. R., Robinson, E. H. (1993) Elevated dietary vitamin C concentrations did not improved resistance of channel catfish, lctalurus punctatus, against Edwardsiella ictaluri infection. Aquaculture. 117: 303-312.
17. Li, M. H., Wise, D. J., Robinson, E. H. (1998) Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish lctalurus punctatus. J. World Aquaculture Soc. 29: 1-8.
18. Li, Y., Lovell, R. T. (1985) Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. J. Nutr. 115: 123-131.
19. Li, M. H., Robinson, E. H. (1999) Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. J. App. Aquaculture. 9: 53-79.
20. Liu, P. R., Plumb, J. A., Guerin, M., Lovell, R. T. (1989) Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish lctalurus punctatus in ponds. Dis. Aquat. Org. 7: 191-194.
21. Men, Y., Audran, R., Thomasin, C., Eberl, G., Demotz, S., Merkle, H. P., Gander, B., Corradin, G. (1999) MHC class 1- and II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. Vaccine. 17:1047-1056.
22. Mikryakov, V. R., Lapirova, T. B., Soltani, M., Mavrin, A. S., Vinogradov, G. A. (2002) Influence of sublethal concentions of some heavy metal salts (Hg, Cd and Cu) on the contents of lysozyme in tissues of sturgeon fingerlings (Acipenser baeri). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22: 15-20.
23. Moreau, R., Dabrowski. K. (1996) The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserids (Chondrostei) and teleost (Teleostei) fishes. J. Comp. Physiol. B. 166:178-183.
24. Moreau, R., Dabrowski, K., Sato, P. H. (1999a) Renal L-gulono-l, 4-lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Aquaculture. 180: 359-372.
25. Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S., Cihla, F. (1999b): Vitamin C- vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* R.), a fish able to synthesize ascorbic acid. J. Applied Ichth. 15: 250-257.
26. Moreau, R., Kaushik, S. J., Dabrowski, K. (1996) Ascorbic acid status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt): Tissue concentration, mobilisation and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Physiology and Biochemistry. 15: 431-438.
27. Navarre, O., Halver, J. E. (1989) Disease resistance and homoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture. 79: 207-221.
28. Nitzan, S., Angeoni, H., Gur, N. (1996) Effects of ascorbic acid polyphpsphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. The Israeil J. Aquac. Bamidgeh. 48:133-141.
29. Roberts, M. L., Davies, S. J., Pulsford, A. L. (1995) The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Fish and Shellfish Immunol. 5:27-38.
30. Robertson, B. S. (1990) Bacterial agglutination. In: Stolen, J. S., et al (Eds.). Tech. Fish immunol. 81-87.
31. Sandens, K. (1991) Vitamin C in fish nutrition - a review. Fisk. Dir. Skr., Ser. Emeering, 4: 3-32.
32. Sandens, K., Hansen, T., Killie, J-E. A., Waagbe, R. (1990) Ascorbate-2- sulfate as a dietary vitamin C source for atlantic salmon (*Salmo salar*): 1. Growth, bioactivity, haematology and humoral immune response. Fish Physiol. and Bioch. 8: 419-427.
33. Soltani, M., Kalbassi, M. R. (2001) Protection of Persian sturgeon (Acipenser persicus) fingerling

against Aeromonas hydrophila septicaemia using three different antigens. Bull. of Euro. Asso. Fish Pathol. 21: 235-239.

34. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schliep, W., Hole, R. (1996) Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 143:123-133.
35. Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R. (1998) Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunol. 8: 409-424.
36. Waagb0, R., Glette, J., Nilsen, E. R., Sandnes, K. (1993) Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). J. Physiol. and Biochem. 12:61-73.
37. Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schliep, W., Meier, W. (1998) Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Diseases. 21: 127-137.

J.Vet.Res. 63,5: 337-343,2008

EFFECTS OF DIFFERENT LEVELS OF ASCORBIC ACID ON SOME VARIABLES OF JUVENILE GREAT STURGEON *(HUSO HUSO)* IMMUNITY INDICES

Falahatkar, B.[1], Soltani, M.[2]*, Alishahi, M.[3], Zargar, A.[4]

[1]*Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Gilan, SowmehSara-Iran*

[2]*Aquatic Animal Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Aquatic Animal Health Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University ofChamran, Ahvaz-Iran*

[4]*Graduated PhD student, Aquatic Animal Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 12 December 2006 , Accepted 1 May 2007)

Abstract:

Effects of different levels of ascorbic acid consisting of 0, 100, 200, 400, 800 and 1600 mg/kg feed were examined on some immune variables of juvenile great sturgeon (*Huso huso*) weighing 38 g at water temperature 20°C for 16 weeks. Significant difference were observed in level of lysozyme in fish treated 400 and 1600 mg compared with control group 8 week post-treatment ($p<0.05$). Also levels of lysozyme in fish treated ascorbic acid were insignificantly higher than control group ($p>0.05$) 16 weeks post-treatment. Maximum level of leucocytes population was seen in fish treated 100 and 200 mg ascorbic acid 8 and 16 weeks post-treatment, respectively. Maximum antibody titer was observed in fish fed diet 200mg ascorbic acid ($p>0.05$). It was no found any mortality in treatment groups after challenge with *Aeromonas hydrophola* compared with 29.9% mortality in control group ($p<0.05$). The obtained results showed that vitamin C has beneficial effects on some immunological variables of juvenile great sturgeon making fish become more resistance to infectious diseases, especially during early life stage at which fish are more sensitive to the pathogenic microorganisms and unfavorable environmental conditions. Therefore, using vitamin C in early life stage of great sturgeon can cause an enhancing in immune responses of fish resulting in resistance to infectious and uninfectious diseases.

Key words: Ascorbic acid, great sturgeon (*Huso huso*), *Aeromonas hydrophila*, lysozyme, antibody titer.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117045, Fax: 021-66933222**