مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۱، ۱۷-۱۱

تاثیر بتا گلوکان بر رشد، بقاء و کارآیی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

غلامرضا بادزهره[۱] مهدی سلطانی[۲*] غلامرضا شاه حسینی[۳] محمود نفیسی بهابادی[۱]

۱) گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس، بوشهر - ایران.

۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی و صنعتی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای کرج، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۹ مرداد ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۲۹ شهریور ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: گلوکان‌ها ترکیبات پیچیده پلی ساکاریدی بوده که از دیواره سلول مخمرها و قارچ‌ها استخراج می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند سیستم ایمنی ماهی را تحریک نمایند. **هدف:** هدف از این تحقیق بررسی تاثیر بتا گلوکان (ماکروگارد) بر برخی از شاخص های رشد، بقا و برخی پارامترهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (۰/۳۲±۱۰ گرمی) و نیز اثر آن بر کارایی واکسن استرپتوکوکوزیس مورد می‌باشد. **روش کار:** میزان ماکروگارد در غذای ماهی‌ها یک گرم در هر کیلوگرم غذای تجارتی بود و از واکسن ساخت داخل بصورت حمام برای واکسیناسیون ماهی‌ها استفاده شد. تیمارها شامل تیمار ماکروگارد (تغذیه ماهی‌های واکسینه نشده با غذای حاوی ماکروگارد به میزان یک گرم در هر کیلوگرم غذای)، تیمار دوم (تغذیه ماهی‌های واکسینه نشده با غذای حاوی ماکروگارد و بدون ان با تناوب ۱۰ روز)، تیمار سوم (تغذیه ماهی‌های واکسینه‌شده با غذای حاوی ماکروگارد)، تیمار چهارم (تغذیه ماهی‌های واکسینه شده با غذای بدون ماکروگارد) و تیمار شاهد بود که در یک دوره ۴۲ روزه مورد ازمایش قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج حاصله نشان داد که رشد ماهی (افزایش وزن) در همه تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی داری ($p<0/05$) داشت. همچنین تفاوت معنی داری در میزان بقا ماهیان در بین تیمارهای مختلف و نیز در مقایسه با تیمار شاهد دیده نشد ($p>0/05$). میزان لیزوزیم سرم در تیمارهای ماکروگارد، واکسن و ماکروگارد بهمراه واکسن بصورت معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود بطوریکه بیشترین مقدار ان در تیمار ماکروگارد بهمراه واکسن (۲.۷ میکروگرم بر میلی لیتر) و کمترین ان در تیمار شاهد (۰.۵ میکروگرم بر میلی لیتر) قابل سنجش بود ($p<0/05$). شمارش لکوسیتی نیز در بین تیمار شاهد (۳.۳ درصد نوتروفیل) و سایر تیمارها (۶.۶ درصد نوتروفیل) از اختلاف معنی داری برخوردار بود ($p<0/05$). نتایج بقاء در حمام با کتریایی با سوش حاد استرپتوکوکوس اینیایی در تیمار شاهد ۵۵ درصد در حالیکه در تیمارهای واکسن، ماکروگارد همراه واکسن، ماکروگارد (تمام طول دوره) و ماکروگارد (هر ده روز یکبار) به ترتیب ۸۶۷۵، ۶۰، درصد بوده است. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن بتا گلوکان به غذا تاثیر مثبتی بر رشد و پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل آلای رنگین کمان داشته و می‌تواند کارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: ماکروگارد، سیستم ایمنی، ماهی، جیره غذایی.

مقدمه

رشد چشم گیر و روز افزون صنعت آبزی پروری و بکارگیری روش‌های متراکم و فوق متراکم برای افزایش تولید در واحد سطح موجب مشکلاتی برای این صنعت شده است که از آن جمله می‌توان به بروز بیماری‌های عفونی و خسارات ناشی از آنها، استفاده مکرر از برخی آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی و در نتیجه به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان اشاره نمود. این‌گونه مشکلات موجب شده تا طی سال‌های اخیر به روش‌های پیش‌گیری مانند واکسیناسیون و اقدامات قرنطینه‌ای و نیز استفاده از مواد محرک ایمنی برای ارتقاء واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهیان و سخت پوستان پرورشی علیه بیماری‌های عفونی توجه جدی شود(۴،۲۰،۲۵). در این میان استفاده از برخی مواد محرک ایمنی در غذای آبزیان پرورشی متداول و روتین شده است(۳،۷،۹،۱۰). از جمله مواد محرک ایمنی متداول در آبزی پروری می‌توان به ترکیبات حاوی گلوکان‌ها اشاره نمود که با تحریک واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی مانند فاگوسیتوزیس موجب کاهش استرس و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی می‌شوند (۲،۳،۷،۱۵،۱۹،۲۱،۲۳). علی‌رغم رشد قابل توجه صنعت آبزی پروری در ایران هنوز استفاده از روش‌های پیش‌گیری و کنترلی مانند واکسن‌ها و مواد محرک ایمنی عملیاتی نشده است. این در حالی است که بیماری‌های عفونی متعددی مانند نکروز عفونی بافت‌های خون‌ساز، نکروز عفونی پانکراس، استرپتوکوکوزیس و یرسینوزیس هر ساله موجب خسارات فراوانی به صنعت قزل آلای کشور می‌شود (۲۶،۳۴) در این میان خسارات اقتصادی ناشی از بروز استرپتوکوکوزیس در ایران حدود ۱۵ میلیارد تومان در سال برآورد می‌شود(۲۷). از آنجایی‌که برخی از بیماری‌های مذکور مانند بیماری‌های ویروسی و استرپتوکوکوزیس به درمان‌های آنتی بیوتیک‌ها به‌خوبی پاسخ نمی‌دهند لذا توجه به اقدامات پیش‌گیری و کنترلی برای کاهش خسارات اقتصادی وارده امری ضروری است(۲۲،۳۲،۳۳). از طرف

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: msoltani@ut.ac.ir

دیگر بیشترین خسارات مراکز تکثیر قزل آلا عمدتاً در مراحل لاروی و بچه ماهی اتفاق می‌دهد که ناشی از عدم تکامل سیستم‌های ایمنی ماهیان در این دوره از رشد است. لذا بکارگیری این‌گونه مواد محرک ایمنی همراه با واکسیناسیون امری بدیهی و ضروری است. با توجه به ساخت واکسن ضد استرپتوکوکوزیس در داخل کشور نیز ضرورت مطالعه و یافتن روش‌هایی برای ارتقاء کارآیی آن در جهت پیشگیری از این بیماری در بین ماهیان قزل الا به‌خوبی حس می‌شود. در این راستا هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ماده محرک ایمنی ماکروگارد بر رشد، بقاء و کارآیی واکسن استرپتوکوکوزیس ساخت داخل در بچه ماهیان قزل آلا می‌باشد.

مواد و روش کار

ماهی: در این مطالعه از بچه ماهیان قزل آلای رنگین‌کمان با وزن تقریبی ۱۰±۰/۳۲ گرمی تهیه شده از یکی از مزارع پرورش قزل‌آلا واقع در شهرستان یاسوج استفاده شد. پس از انتقال بچه ماهیان (۴۵۰ ماهی) به سالن نگهداری ماهی گروه شیلات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس (زمستان ۸۷) به‌مدت ۱۰ روز به شرایط جدید سازگاری داده شدند.

فاکتورهای کیفی آب: فاکتورهای کیفی آب مورد استفاده در این مطالعه شامل درجه حرارت (۱۶-۱۷سانتیگراد)، اکسیژن (۸-۹میلیگرم در لیتر)، سختی (۳۰۰میلیگرم در لیتر کربنات کلسیم) دی اکسید کربن (کمتر از ۹میلیگرم در لیتر)، نیتریت (کمتر از ۰/۱میلیگرم در لیتر) و آمونیاک (کمتر از ۰/۰۱میلیگرم در لیتر) و pH (۷-۸) در محدوده مطلوب قرار داشتند.

به‌علاوه منبع آب مورد استفاده آب چاه بوده که با استفاده از هوادهی و تزریق اکسیژن میزان اکسیژن مورد نیاز آن تأمین و نسبت به حذف گازهای سمی آن اقدام می‌گردید.

محرک ایمنی: در این مطالعه از نوعی محرک ایمنی به نام تجاری ماکروگارد (MacroGard) ساخت شرکت (ASA, TromsØ, Norway Biotec pharmacon) نروژ استفاده شده است. ترکیب فوق نوعی بتاگلوکان مستخرج از مخمر ساکارومیس سرویسیه (*cerevisiac accharomyces*) می‌باشد.

واکسن: واکسن مورد استفاده در این تحقیق عبارت از واکسن تک ظرفیتی ضد استرپتوکوکوزیس اینیایی عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان می‌باشد که طی شماره ثبت (۰۰۸۹۳۰) توسط واحد فرآورده‌های بیولوژیک جهاد دانشگاهی واحد تهران عرضه شده است. از واکسن مذکور به میزان یک لیتر برای واکسیناسیون ۱۰۰ کیلو ماهی استفاده می‌شود.

واکسیناسیون: **پس از** دوره سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۳۰ قطعه به ازاء هر تانک ۲۰۰ لیتری (هر تیمار در سه تکرار) سازمان دهی شدند. سپس ۲ گروه از ماهیان با استفاده از واکسن فوق‌الذکر واکسینه شدند. برای واکسیناسیون نیز از روش حمام به مدت ۵ دقیقه و در حضور هوادهی استفاده شد. به ازاء هر لیتر واکسن مذکور ۱۰۰ کیلو ماهی قابل واکسینه می‌باشد.

تجویز ماکروگارد: این طرح در قالب ۴ تیمار و سه تکرار به‌همراه گروه شاهد و به‌صورت کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. یک روز پس از واکسیناسیون یک گروه از ماهیان واکسینه و نیز یک گروه از ماهیان غیر واکسینه مورد تجویز ماکروگارد به صورت خوراکی و به میزان ۱ گرم به ازاء کیلوگرم غذا (۲ درصد وزن بدن در ۳ وعده) در روز قرار گرفتند (۶،۱۶). گروه دوم ماهیان واکسینه شده و گروه دوم ماهیان غیر واکسینه (شاهد) نیز توسط غذای بدون ماکروگارد تغذیه شدند (جدول ۱). به‌علاوه گروه پنجم شامل ۳۰ عدد ماهی در سه تکرار مورد تجویز ماکروگارد با میزان ذکر شده برای تیمارهای قبلی اما با فواصل هر ۱۰ روز تغذیه با ماکروگارد و ۱۰ روز تغذیه بدون ماکروگارد لحاظ گردید غذای مورد استفاده ساخت شرکت الراکوا- نروژ بود که ترکیب شیمیایی ان در جدول ذیل آمده است. ماهی‌ها به‌مدت ۴۲ روز با این غذا تغذیه شدند.

سنجش فاکتورهای رشد: طی دوره رشد (۴۲ روز) هر هفته یک بار نسبت به سنجش وزن ماهیان اقدام و شاخص‌های رشد شامل رشد روزانه (نسبت افزایش وزن به طول روزهای پرورش)، وزن نهایی، ضریب رشد ویژه (Specific Growth Rate) (lnw) 100* (2-lnw 1 /T) در این فرمول w2 = وزن نهایی، **W1** = وزن اولیه و **T** = طول روزهای پرورش است، ضریب تبدیل غذایی (Feed Convertion Ratio) (نسبت غذای خورده شده به افزایش وزن به‌دست آمده) اندازه گیری شد. به‌علاوه میزان تلفات روزانه نیز ثبت گردید.

بیماریزایی تجربی و تعیین درصد بقاء: به منظور ارزیابی میزان مقاومت ماهیان و تأثیر ماکروگارد بر کارآیی واکسن ماهیان تیمارهای فوق‌الذکر به‌صورت جداگانه و با غلظت 10^8 سلول به ازاء میلی لیتر از استرپتوکوکوس اینیای به‌مدت ۵ دقیقه حمام باکتریایی داده شدند. پس از آن ماهیان به مدت ۲ هفته نگهداری و تلفات روزانه یادداشت گردید. به منظور تایید علت تلفات از بافت کلیه ماهیان تلف شده بر روی محیط ژلوز خون نیز کشت باکتریایی داده شد. در پایان هفته دوم با بیهوش نمودن ماهیان باقی مانده (زنده) از آنها خون‌گیری و از نمونه‌های خونی برای سنجش برخی فاکتورهای سلولی و سرمی خون استفاده شد (۲۴،۳۱).

سنجش فاکتورهای خونی: برای مطالعات هماتولوژی از هر تیمار به تعداد ۱۴ نمونه ماهی باقی مانده خون‌گیری (پس از بیهوشی با اسانس گل میخک بادوز ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر) به‌عمل آمده و از نمونه‌های خون به‌دست آمده ابتدا بلافاصله یک قطره آن برای تهیه گسترش‌های خونی اقدام و باقی مانده آن به‌مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس سرم‌های مربوطه جداسازی و تا انجام آزمایش لیزوزیم در ۲۰- درجه‌سانتیگراد نگهداری شدند. گسترش‌های خونی تهیه شده را ابتدا خشک نموده (در معرض هوای آزاد) سپس با متانول فیکس نموده و رنگ

گیمسا رنگ‌آمیزی و عملیات شمارش تفریق لکوسیتی در زیر میکروسکوپ معمولی به‌عمل آمد(۱۴)

سنجش میزان لیزوزیم سرم: برای سنجش میزان لیزوزیم در نمونه‌های سرم از روش توصیه شده توسط در سال ۱۹۹۰ Ellis استفاده شد(۸). به‌طور خلاصه مقدار ۱/۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزو دیکتیکوس (سیگما) (مقدار ۰/۳۷۵ میلی‌گرم به ازاء میلی‌لیتر تهیه شده در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲) با مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم (هود و ماهی یک نمونه) مخلوط و میزان جذب نوری سنجیده می‌شد. سپس از محلول بافر فسفات سدیم به عنوان نمونه کنترل (blank) استفاده گردید. به‌علاوه با استفاده از لیزوزیم (محصول سیگما) نسبت به تهیه نمودار استاندارد اقدام گردید و نتایج حاصله با استفاده از نمودار استاندارد بر حسب میکروگرم (میکرو لیتر) به ازاء میلی‌لیتر محاسبه گردید(۸). قابل ذکر است که میزان فاکتورهای خونی و لیزوزیم در تیمار پنجم (مصرف ماکروگارد به فواصل ۱۰ روز) به‌علت از دست دادن نمونه‌های اخذ شده قابل اندازه‌گیری نبود.

روش آماری مورد استفاده: در این مطالعه با استفاده از نرم افزار اماری spss تجزیه واریانس یک‌طرفه میانگین‌ها (ANOVA One- Way) استخراج و از تست دانکن برای معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح (۰/۰۵ درصد) استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از رشد بچه ماهیان در تیمارهای مختلف و طی یک دوره ۴۲ روزه در جدول ۱ آمده است. بر اساس نتایج مذکور بیشترین افزایش رشد روزانه در تیمار ماکروگارد اتفاق افتاد که برابر ۰/۲۹۳ گرم بود و کمترین میزان افزایش رشد روزانه نیز در تیمار شاهد با ۰/۲۲۶ دیده شد از این نظر اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد و سایر تیمارها بوده است بر اساس این داده‌ها تیمارهای ماکروگارد، واکسن و واکسن همراه ماکروگارد و تیمار ماکروگارد هر ۱۰ روز یک‌بار در طول آزمایش از افزایش رشد معنی‌دار (p<۰/۰۵) در مقایسه با تیمار شاهد برخوردار بوده‌اند اما باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. از نظر وزن نهایی نیز تیمار شاهد با ۱۸/۷۶۶ گرم کمترین وزن نهایی را دارا بود و از این نظر با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت(p<۰/۰۵). تیمار ماکروگارد با ۲۲/۱۶ بیشترین افزایش وزن را دارا بوده و اختلاف معنی داری نیز با سایر تیمارها نداشت بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری دیده نشد(p>۰/۰۵). بیشترین ضریب رشد ویژه نیز در تیمار ماکروگارد برابر ۲/۰۶ و کمترین آن در تیمار شاهد برابر ۱/۶۸ بود. از نظر ضریب رشد ویژه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ماکروگارد و ماکروگارد به‌همراه واکسن دیده نشد. بین تیمار واکسن به‌همراه ماکروگارد و ماکروگارد هر ۱۰ روز یک‌بار نیز اختلاف معنی‌داری دیده نشد(p>۰/۰۵). به‌علاوه ضریب تبدیل غذایی در هر چهار تیمار در دامنه ۱/۳۳-۱/۲ قرار داشت و فاقد اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). میزان بقاء هم در هر چهار تیمار در دامنه ۹۸-۹۶ درصد بود و فاقد اختلاف معنی‌دار بود (p>۰/۰۵).

شمارش لکوسیتی: نتایج شمارش لکوسیتی در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج فوق بیشترین و کمترین میزان نوتروفیل‌ها به‌ترتیب در تیمارهای واکسن همراه ماکروگارد و شاهد مشاهده گردید (p<۰/۰۵). مقدار جمعیت نوتروفیلی در تیمارهای واکسن ماکروگارد و واکسن همراه ماکروگارد فاقد اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) اما در مقایسه با تیمار شاهد از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است (p<۰/۰۵).

درصد بقاء پس از تولید تجربی بیماری: بعد از حمام باکتریایی و نگهداری ماهیان به‌مدت ۲ هفته میزان بقاء در تیمار شاهد ۵۵ درصد در حالی‌که در تیمارهای واکسن و واکسن همراه ماکروگارد به‌ترتیب ۷۵ و ۸۶ درصد بوده که از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود (p<۰/۰۵). به‌علاوه میزان بقا در تیمارهای ماکروگارد (مصرف روزانه) و ماکروگارد به‌صورت مصرف هر ۱۰ روز به‌ترتیب ۶۰ و ۵۵ درصد بوده که در مقایسه با گروه شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است (p>۰/۰۵).

لیزوزیم: نتایج حاصل از سنجش لیزوزیم در تیمارهای چهارگانه نشان داد که بیشترین میزان لیزوزیم سرم به‌ترتیب در تیمارهای واکسن همراه ماکروگارد (۲/۷)، واکسن (۲/۱)، ماکروگارد (۲) و شاهد (۰/۷) دیده شد. مقدار لیزوزیم در تیمارهای سه گانه در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۵) اما در بین سه تیمار مربوط (واکسن، ماکروگارد، واکسن همراه ماکروگارد) فاقد اختلاف معنی‌دار بود (p>۰/۰۵).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از ماکروگارد به میزان ۱ گرم به ازاء کیلوگرم غذا تأثیر قابل توجهی بر فاکتورهای رشد و تحریک برخی پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم سرم و جمعیت لکوسیتی) ماهی قزل‌آلا می‌گذارد. به‌علاوه استفاده از این محرک ایمنی همراه واکسن نه تنها موجب ارتقاء فاکتورهای رشد ماهی می‌گردد بلکه از طریق نقش تقویتی که برای واکسن ایفا می‌نماید موجب افزایش کارآیی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس می‌شود. علت افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلا در تیمارهای واکسن همراه ماکروگارد و نیز ماکروگارد به تنهایی به استرپتوکوکوس اینیایی مشاهده شده در این مطالعه ناشی از تأثیر و تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان باشد زیرا نتایج حاصل از شمارش لکوسیتی و نیز سنجش لیزوزیم سرم بیانگر افزایش بیشتر این فاکتورها در ماهیان تیمارهای ماکروگارد و ماکروگارد همراه واکسن می‌باشد. در این خصوص مطالعاتی توسط سایر محققین انجام گرفته است که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Russo و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی تأثیر ماکروگارد برکارآیی واکسن ضد استرپتوکوکوس اینیایی در بچه کوسه ماهیان ۰/۴-۱/۴ گرمی

جدول ۱ـ ترکیب شیمیایی غذای مورد استفاده در تغذیه ماهی قزل الای رنگین کمان (بر اساس وزن خشک).

پروتئین خام (درصد)	۵۰
کربوهیدرات (NFE) (درصد)	۱۵
چربی خام (درصد)	۲۰
خاکستر خام (درصد)	۹
فیبر خام (درصد)	۱
انرژی ناخالص (مگاژول برکیلوگرم گرم جیره)	۵۳/۷۲

جدول ۲- نتایج شاخص های رشد (Mean ±SD) در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان تحت تجویز ماکروگارد، واکسن ضد استرپتوکوکوزیس و واکسن همراه ماکروگارد طی یک دروه 42 روزه در دمای ۱۷-۱۶ درجه سانتیگراد. مقادیر میانگین ها در هر ردیف با حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی دار نشان می دهند (p<۰/۰۵).

	تیمار اول (شاهد)	**تیمار دوم (واکسن)**	**تیمار سوم (ماکروگارد)**	**تیمار چهارم (واکسن+ماکروگارد)**	**تیمار پنجم (تجویز ماکروگارد هر ۱۰ روز یک بار)**
وزن اولیه (گرم)	۹/۲۰± ۰/۷	۹/۲۱±۰/۲۶	۹/۲۸±۰/۴۱	۹/۲۸±۰/۴	۹/۲±۰/۳۵
وزن نهایی (گرم)	۱۸/۷۶± ۱/۲ ^{c}	۲۱/۰۰±۱/۸ ^{b}	۲۲/۱۶±۲/۴ ^{a}	۲۱/۷±۱/۹ ^{b}	۲۱/۱۶ ±۱/۷ ^{b}
رشد روزانه (گرم)	۰/۲۲۶±۰/۰۲ ^{b}	۰/۲۶۳±۰/۰۶ ^{a}	۰/ ۲۹۳ ±۰/۰۵ ^{a}	۰/۲۷۵ ±۰/۰۴ ^{a}	۰/۲۷۴ ±۰/۰۴ ^{a}
ضریب رشد ویژه	۱/۶۸ ±۰/۱۲ ^{c}	۱/۷۶ ±۰/۱۳ ^{b}	۲/۰۶±۰/۱۶ ^{a}	۱/۹۳ ±۰/۱۵ ^{ab}	۱/۸۷±۰/۱۳ ^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۲ ±۰/۰۹	۱/۲۱±۰/۰۵	۱/۳۳ ±۰/۰۸	۱/۱۸ ±۰/۱۷	۱/۲۰ ±۰/۰۸
بازماندگی قبل از آلوده سازی (٪)	۹۶ ±۴/۴	۹۴ ±۵	۹۷ ±۳/۸	۹۸ ±۴/۹	۹۸ ±۶/۸

جدول ۳ ـ شمارش لکوسیتی در تیمارها به درصد (Mean ±SD).

تیمار	**نوتروفیل ها (٪)**	**مونوسیت ها (٪)**	**لمفوسیت ها (٪)**
شاهدc	۳/۳±۱/۱ ^{c}	۱/۳±۱/۲	۹۱/۳±۳/۸
واکسن	۴/۶±۱/۹ ^{ba}	۹/۳±۱/۶	۹۱/۶±۶/۱
ماکروگارد	۶/۶±۲/۱ ^{ba}	۴/۳±۱/۶	۹۲/۶±۵/۱
واکسن+ماکروگارد	۸/۶±۱/۸ ^{a}	۹/۶±۱/۷	۹۰/۶±۳/۱
ماکروگارد در فواصل ۱۰ روز	۶/۱±۱/۳ ^{ba}	۱/۳±۱/۴	۹۱/۳±۶/۸

انجام شد نشان داد که مصرف خوراکی ماکروگارد به میزان ۱ گرم به ازاء یک کیلوگرم غذا به میزان ۳ درصد وزن بدن به مدت ۲۴ روز موجب بیش از ۷۰ درصد بقاء در ماهیان دریافت کننده واکسن همراه ماکروگارد گردید در حالی که این میزان بقاء در گروه دریافت کننده ماکروگارد کمتر از ۶۵ درصد بود (p<۰/۰۵). به هر حال در مطالعه نامبردگان تفاوتی در میزان افزایش رشد در بین گروه های مورد اشاره دیده نشد (۲۲). siwicki در سال ۲۰۰۹ با مطالعه ای بر روی سوف نشان داد که با مقادیر ۱ و ۲ گرم گلوکان در غذای لاروهای این ماهی میزان لیزوزوم و ایمونوگلوبین خون به طور معنی داری افزایش می یابد (۲۸). Mirsa و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه ای بر روی کپور هندی نشان داند که با تزریق بتا گلوکان به این ماهی میزان لیزوزوم ان به طور معنی داری افزایش یافت (۱۶).

در ارتباط با تأثیر بتا گلوکان در فاکتورهای رشد نیز نتایج این مطالعه با نتایج سایر محققین مربوطه همخوانی دارد. برای مثال در مطالعه Misra و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثر بتا گلوکان را بر روی افزایش رشد کپور ماهیان هندی بررسی نمود و نشان دادند که تیمارهای حاوی بتا ـ گلوکان از ضریب رشد ویژه (SGR) بیشتری نسبت به نمونه های شاهد برخوردار بودند (۱۶). در مطالعه ای دیگر توسط Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی گونه Mitten crab (*Eriocheir sinensis*) مشخص شد که اضافه کردن ۰/۵ تا ۱ گرم ماکروگارد به هر کیلوگرم غذا ضریب رشد ویژه این موجود را افزایش می دهد (۳۳). در تحقیقی دیگر Chang و همکاران افزایش رشد میگوی مونودون را تحت تأثیر ماکروگارد نشان دادند (۵). همین طور در مورد اثر ماکروگارد بر روری ضریب رشد ویژه بر روی یک گونه ماهی (*Pseudosciaena crocea*) نیز مشخص شده است که در غلظت ۰/۵ درصد ماکروگارد در جیره غذایی رشد بیشتر از مقدار ۱ درصد ماکروگارد است (۱). بنابراین علی رغم تأثیر مثبت گلوکان در رشد ابزیان، دلیل این افزایش وزن ناشی از مصرف گلوکان ها هنوز مشخص نشده است (۱). به علاوه نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مصرف روزانه ماکروگارد به میزان یک گرم بازای هر کیلوگرم غذا با مصرف دوره ای ان یعنی مصرف ۱۰ روز مداوم و ۱۰ روز توقف تغذیه با ماکروگارد تفاوت معنی داری از نظر شاخص های رشد با همدیگر نداشت. این اختلاف همچنین با تیمارهای واکسن، واکسن همراه با ماکروگارد نیز معنی دار نبود (نمودار ۱). بنابرین با توجه به این که مصرف دوره ای ماکروگارد میتواند اثرات مشابه ای با مصرف روزانه آن داشته باشد لذا از نظر اقتصادی مصرف دوره ای آن مقرون به صرفه می باشد. به هر حال نتایج حاصل از بیماری زایی تجربی نشان داد که مصرف دوره ای ماکروگارد منجر به درصد بقا کمتری در مقایسه با مصرف روزانه آن گردیده است.

همچنین مصرف ماکروگارد در تیمارهای مختلف موجب افزایش معنی‌دار جمعیت نوتروفیل‌های خونی در مقایسه با گروه شاهد گردید ولی در جمعیت‌های لنفوسیتی و مونوسیتی تفاوت معنی‌داری ایجاد نشد. در مطالعه Jeney(۱۱) بر روی ماهی قزل‌آلا نی بتاگلوکان‌ها موجب افزایش جمعیت نوتروفیلی ولی باعث کاهش لنفوسیت‌ها گردید. علت این تغییرات در جمعیت لکوسیتی ماهیان نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. درصد بازماندگی ماهی‌ها نیز پس از آلوده شدن به بیماری مورد مطالعه در این تحقیق اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد به‌طوری‌که تیمار واکسن به‌همراه ماکروگارد با دارا بودن ۸۳ درصد بازماندگی بیشترین مقدار را داراست. این وضعیت در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است. Russo در سال ۲۰۰۶ با مطالعه بر روی یک نوع کوسه نشان داد که در تیمار واکسن به‌همراه گلوکان در بقا ۷۲ درصد و در تیمار بدون استفاده از واکسن درصد بازماندگی ۱۴ درصد بوده است(۲). مطالعه دیگر توسط Couso در سال ۲۰۰۳ نشان داد که کمترین میزان مرگ و میر ماهی سیم دریایی در مقابل بیماری pasteurellosis با اضافه نمون یک گرم بتا گلوکان در جیره به‌دست می‌آید(۶). در مقادیر ۵ و ۱۰ گرم در هر کیلوگرم جیره میزان مرگ و میر بترتیب برابر و بیشتر از نمونه شاهد بوده است. Jeney و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی قزل آلای رنگین‌کمان نشان دادند که افزایش بتا گلوکان در مقادیر زیاد اثر مثبتی روی کاهش مرگ و میر این ماهی ندارد(۱۲) به‌علاوه نتایج سایر مطالعات به‌عمل آمده نشان می‌دهد که مصرف خوراکی ترکیبات گلوکان در ماهیان واکسینه شده علیه برخی بیماری‌ها نظیر فرونکولوزیس، انتروکوکوزیس، سپتمی سمی ناشی از آئروموناس هایدروفیلا و سودوموناس فلورسنس موجب افزایش بقاء آنها در برابر بیماری‌های مذکور گردید(۱۳،۱۷،۲۸،۲۹،۳۰). به‌هرحال در برخی مواقع مصرف به تنهایی گلوکان‌ها کمک چندانی به افزایش بقاء ماهیان نداشته است. برای مثال در مطالعه‌ای توسط Ogier de Baulny و همکاران در سال ۱۹۹۶ مصرف گلوکان‌ها در گربه ماهی موجب افزایش واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی گردید اما بر میزان بقاء ماهیان در برابر عفونت تجربی با ادوارد زیلاتارلا تأثیری نداشت(۱۸).

در جمع‌بندی مصرف ماکروگارد در بچه ماهیان قزل‌آلا موجب افزایش شاخص‌های رشد به‌ویژه افزایش وزن ماهیان می‌شود به‌علاوه مصرف ماکروگارد و همراه واکسن یا به تنهایی به افزایش مقاومت ماهیان در برابر سپتی سمی ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی کمک می‌کند. به‌هرحال میزان این نوع تأثیرات بستگی به شرایط پرورشی و نگهداری ماهیان دارد زیرا فاکتورهای زیادی از جمله کیفیت آب به‌ویژه دمای آب، تغذیه، مدیریت پرورشی، عوامل استرس‌زا در کارآیی واکسن‌ها و مواد محرک ایمنی اثرات قابل توجهی دارند. بنابراین در عمل توصیه می‌شود تا در مزارعی که با مشکل و خطر بروز بیماری استرپتوکوکوزیس مواجه هستند، علاوه بر واکسیناسیون به موقع از مواد محرک ایمنی نظیر ماکروگارد نیز برای تقویت ایمنی اختصاصی و کمک به کارآیی واکسن استفاده شود. حتی تجویز این ماده محرک بدون استفاده از واکسیناسیون نیز از تأثیرات قابل توجهی بر رشد ماهیان برخوردار بوده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه خلیج فارس به‌خاطر تأمین مالی این پروژه تقدیر و تشکر می‌گردد. از ریاست دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس و دانشجویان گروه شیلات آقای ایوب سلیمانی، سجاد پور مظفر و سایر دانشجویان برای همکاری صمیمانه اشان در اجرای این طرح کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1. Ai,Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. et. al. (2007) Effects of dietary B-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish Shellfish Immunol. 22:394-402.
2. Bagni, M., Romano, M. G., Finoia, L., Abelli, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast β-1,3-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Shellfish Immunol.18: 311-325.
3. Burrells, P. D., Williams, P. F., Forno. (2001) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds Effects on resistance to disease in salmonids. Aquaculture. 199: 159-169.
4. Chang,C.,Chen,H.Y.,Su,MS.(2000)Immunomodulation by dietary in the brooders of the grass prawn Penaeus monodon. Fish Shellfish Immunol. 10:505-514.
5. Chang, C. F., Changa, M. S., Houng, Y. C. (2003) Dietary β-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. 15:297-310.
6. Couso, N. et. al.(2003) Effect of oral administration of glucans on theresistance of ilthead seabream to

pasteurellosis. Aquaculture. 219: 99-109.

7. Dina, R., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Mukherjee, S. C. (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specifc immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish Shellfish Immunol. 22 :477-486.
8. Ellis, A. E. (1990) Lysozyme assays. Techniques in Fish Immunology. SOS Publication. Wagheningen, The Netherland.
9. Jaya, K., Sahoo, P. K. (2006) Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. Aquaculture. 255: 133-141.
10. Julia, J., Volman, J., Ramakers, D., Jogchum, P. (2008) Dietary modulation of immune function by β-glucans. Physiol. Behav. 94: 276 - 284.
11. Jeney, G., Galeotti, M. Volpatti, D. Jeney, Z., Anderson, D. P. (1997) Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture. 154 :1-15.
12. Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D. P. (1998) Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture. 154: 1- 15.
13. Itami, T., Kondo, M., Uozu, M., Suganuma, A., Abe, T., Nakagawa., Suzuki, N.et. al. (1996) Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. J. Fish Dis. 19:185-187.
14. Klontz, G. W. et. al. (1994) Fish hematology. In: Techniques in Fish Immunology. Smith, S. A.(ed.). SOS Publication. Wagheningen, The Netherland. p. 121-130.
15. LAndrzej, K., Zdziszaw, Z., Elz, b., Majewska,T., Kowalska, A. (2009) Supplementing the feed of pikeperch (*Sander lucioperca*) juveniles with macrogard and its influence on nonspecifc cellular and humoral defense mechanisms. Aquac.Res. 40: 405-411.
16. Mirsa, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C., Pattnaik, P. (2006) Efect of multiple injections of B-glucan on non-specifc immune response and disease resistance in Labeo rohita fngerlings. Fish Shellfish Immunol. 20: 305-19.
17. Nikl, L., Evelyn, T. P. T., Albright, L.J. (1993) Trials with an orally and immersion-administered B-1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile Chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha. Dis. Aquat. Org. 17: 191-196.
18. Ogier de Baulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Le Gouvello, R. (1996) Effect of long-term oral administration of h-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org. 26: 139-147.
19. Phillip, H., Klesius, J. J., Craig, E. A., Shoemaker, D., Pasnik, k. (2006) A vaccination and challenge model using calcein marked fish. Fish Shellfish Immunol. 20:20-28.
20. Rosario, C., Magarinos, B., Obach, A., Jesus, L. (2003) Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture. 219: 99 - 109.
21. Rodrnguez, A., Cuesta, A., Ortuno, J., Esteban, M. A., Meseguer, J. (2003) immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisia*e strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata L.*). Vet. Immunol. Immunopathol. 96: 183-192.
22. Russo, R., Mitchell, H., Roy, P.,Yanong, E.(2006) Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models .Aquaculture. 256: 105- 110.
23. Rairakhwada, D., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Jha, A., Mukherjee, S. C. (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish Shellfish Immunol. 22: 477-86.
24. SajeevanT.P., Rosamma, P. (2009) Dose/frequency: A critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp

Fenneropenaeus indicus. Aquaculture. 287: 248-252.

25. Sealey, W. M., Barrowsb, F. T., Hangc, A., Johansenb, K. A., Overturf, K., LaPatra, S. E. et. al. (2008) Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β-glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Anim. Feed. Sci. Technol. 141:115-128.
26. Soltani Mehdi, Nikbakht, Gh., Muosavi HAE., Ahmadzadehe, N. (2008) Epizootic outbreaks of lactococosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout in Iran. Bull. Eur. Fish Pathol. 28: 207-212.
27. Soltani, M., Haghighi Karsidani, S., Nikbakht-Brojeni, Gh., Ghasemi, M., Skall, H.F. (2010) Molecular epidemology of zoonotic streptococcosis/ lactococcosis in rainbow trout (Oncorhynchus) aquaculture in Iran. Iranian J. Microbiol. 3:78-89.
28. Siwicki, A. K. et. al. (2009) Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. Aquac. Res. 40: 405-411.
29. Toranzo, A. E., Devesa, S., Lamas, J., Riaza, A., Leiro, J., Barja, J. L. (1995) Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against Enterococcus sp. infection in turbot. Aquaculture. 134: 17- 27.
30. Tuernau, D., Schmidt, H., Kuerzinger, H., Boehm, K.H. (2000) Potency testing of beta-glucan immunostimulating effect in food for ornamental fish.Bull. Eur. Asso. Fish Pathol. 20:143-147.
31. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A. (1996) Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 143: 123-133.
32. Vetvicka,V., Yvin, Jean-Claude. (2004) Effects of marine β-1,3 glucan on immune reactions. Int. Immunopharmacol. 4: 721 - 730.
33. Whittington, R., Lim, C., Klesius., P. H. (2005) Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia,Oreochromis niloticus. Aquaculture. 248 :217 - 225.
34. Zargar, A., Soltani, M., Hematzadeh F., Kazemi, B., Ebrahimzadeh Moussavi, H.A. (2008) Distribution of infectious heamatopoeitic necrosis in five provinces of Iran using PCR and IFAT methods. J. Vet. Res. 63: 99-105.
35. Zhou, j., Wang, Y.H., Ju ,C., Luo, L.Z. (2008) Improvement of innate immune responses and defense activity in mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by oral administration of of β-glucan. Biotechnol. Lett. 30:1721-5.

J. Vet. Res. 67, 1:11-17, 2012

Effects of β-glucan on the growth, survival, and the efficacy of *Anti-streptococcus iniae* vaccine in rainbow trout *(Onchorhynchus mykiss)*

Badzohreh, Gh.R.[1], Soltani, M.[2*], Shah Hoseini, Gh.R.[3], Nafisi Bahabadi, M.[1]

[1]*Fisheries Department of Agricultural and Natural Resources College, Persian Gulf University, Boshehr- Iran.*

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

[3]*Nuclear Science and Technology Research Institute- Agricultural, Medical & Industrial Research School of Karaj,Karaj_Iran.*

(Received 10 August 2011 , Accepted 20 September 2011)

Abstract:

BACKGROUNDS: Glucans are complex polysaccharide components of yeast and fungal cell walls.This compounds can stimulate the fish immune system. **OBJECTIVES:** The present study investigated the effects of Beta glucan(Macrogard) on growth, survival and some immunological parameters of rainbow trout (10 mg) and also on the efficiency of Streptococcus vaccine. **METHODS:** Treatments of macrogard (1 g/kg food/day for 42 days), macrogard (macrogard 1 g/kg diet) with 15 minutes bathin vaccine, vaccine bath without macrogard and control were examined in a 42 daysperiod. **RESULTS:** In all treatments the fish growth (weight) showed a significant increase ($p<0.05$) compared to the control, while there was no significant difference among the treatments. The lyzosyme level of the blood serum showed a significant difference between control and the other treatments, the highest level was observed in the macrogaurd with vaccine treatment (2.7 µg/ml) and the lowest level was observed in the control(0.5 µg/ml). Leukocytes count also had a significant difference between the control (3.3%Nuetrophil) and other treatments (6.6% Nuetrophil) ($p<0.05$). The result of survival of fish challenged with *Streptococcus iniae* via bath route was 55%, while those for vaccine treatment, macrogard plus vaccine, macrogard every day and macrogard every 10 days interval were 75%, 86%, 60& and 55%, respectively. **CONCLUSIONS:** The results of this study showed that supplement of macrogard has positive effect on growth and non-specific immune responses of rainbow trout and can enhance efficacy of anti- *streptococcus iniae* vaccine in this fish.

Key words: Macrogard, immune system, fish, diet.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222**