



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 2, 2023, pages: 67-76
DOI: 10.22124/janb.2023.25702.1218



Effects of different levels of dietary protein and lipid on the skin mucus immune indices in Zebra fish, *Danio rerio*

Farideh Riki^{1*}, Mansoureh Abdolmanafi², Mohammad Sudagar²

1- Deputy of Aquaculture, Offshore Fisheries Department Chabahar, Chabahar, Sistan and Baluchistan, Iran

2- Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

Received 17 April 2023

Revised 16 June 2023

Accepted 21 June 2023

KEYWORDS ABSTRACT

Zebra fish

Mucus immune

Protein

Lipid

The zebra fish, *Danio rerio* is an ornamental freshwater fish. It is important because of beautiful appearance, economic value and has emerged as a pre-eminent vertebrate model for studying genetics. The use of appropriate diets is one of the most important biological components for growth and health fish. Since, protein and lipid are the main components of diet, in this feeding trial, we compared the effects of 9 diets with 3 protein levels (25, 30 and 35%) and 3 lipid levels (4, 8 and 12%) to evaluate the protein and lipid ratio on skin mucus immune indices of zebra fish. A total of 135 pieces of fish were divided into five groups with an average biomass (\pm SD) of 1.23 ± 0.02 g and a sex ratio of 2 to 3 (male / female) were randomly distributed into 27 aquaria (20-L) and fed 3 times daily during 4 months. Results showed that activity of lysozyme, alkaline phosphatase enzymes and soluble protein of zebra fish were significantly higher in the fish fed 35% protein and 12% lipid ($p < 0.05$). In conclusion, protein and lipid have a positive effect on skin mucus immune indices in zebra fish.

*Corresponding author: f.rigi90@yahoo.com





تغذیه آبریان

سال نهم، شماره دوم، تیر ۱۴۰۲، صفحات ۶۷-۷۶

DOI: 10.22124/janb.2023.25702.1218

"مقاله پژوهشی"

تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی زبرا (*Danio rerio*)

فریده ریگی^{۱*}، منصوره عبدالمنافی^۲، محمد سوداگر^۲

۱- معاونت آبی‌پروری، اداره کل شیلات آب‌های دور چابهار، چابهار، سیستان و بلوچستان
۲- گروه تکثیر و پرورش آبریان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸

کلمات کلیدی

ماهی زبرا

ایمنی موکوسی

پروتئین

چربی

چکیده

ماهی زبرا (*Danio rerio*) از ماهیان زینتی آب شیرین است که علاوه بر داشتن ظاهر زیبا و ارزش اقتصادی، به عنوان مدل در تحقیقات علمی دارای اهمیت است. به کارگیری جیره‌های مناسب از مهم‌ترین بخش‌های زیستی برای رشد و سلامت ماهی است. از آنجا که پروتئین و چربی از اجزای اصلی جیره‌اند، در این تحقیق، مقایسه تأثیر ۹ جیره غذایی با سه سطح پروتئین (۲۵، ۳۰ و ۳۵٪) و سه سطح چربی (۴، ۸ و ۱۲٪) بر ایمنی موکوس پوست (میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم، آنزیم الکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئین کل) در ماهی زبرا بررسی شد. برای این منظور ۱۳۵ عدد بچه ماهی به صورت گروه‌های ۵ تایی با میانگین زی توده (\pm انحراف معیار) $0.2 \pm 1/23$ گرم و نسبت جنسی ۲ به ۳ (ماده/نر) به طور تصادفی در ۲۷ آکواریوم ۲۰ لیتری توزیع و ۳ بار در روز به مدت ۴ ماه تغذیه شدند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم، آنزیم الکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئین کل در تیمارهای تغذیه شده با ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی، به طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0.05$). به طور کلی یافته‌های این تحقیق مشخص کرد که پروتئین و چربی، دارای اثر مثبت بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست در ماهی زبرا هستند.

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی را می‌توان یکی از پرسودترین صنایع در دهه‌های اخیر نام برد. ماهیان زینتی به‌علت داشتن رنگ‌های درخشان، شکل و رفتارشان مانند جواهرات زنده هستند. آن‌ها معمولاً آرام، کوچک و دارای رنگ‌های جذاب بوده و در گونه‌های مختلف دسته‌بندی شده‌اند (Mandal et al. 2010) و تجارت آن‌ها در آسیا و نیز سراسر جهان در حال رشد و توسعه است (Tissera, 2012).

از آنجا که ماهیان آکواریومی از یک سو همواره در معرض استرس‌های زیستی مانند عوامل بیماری‌زای باکتریایی، قارچی و انگلی و همچنین انواع استرس‌های غیرزیستی همچون عدم تهویه و تصفیه مناسب در آکواریوم، انواع تنش‌های سرمای و گرمایی، افزایش غلظت متابولیت‌ها مانند آمونیاک قرار داشته (Pourdavoud et al. 2008) و از سوی دیگر، تغییرات هورمونی به‌دنبال عدم رعایت اصول غذایی و عدم استفاده از جیره اختصاصی هر گونه در آکواریوم نیز از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر ماهیان در آکواریوم محسوب می‌شوند (Barton and Iwama 1991). این عوامل باعث شده است که تلاش‌ها در زمینه آبرزی‌پروری به سوی افزایش ایمنی و افزایش رشد گرایش یابد (Ng et al. 2008).

ایمنی، ساز و کار مهم فیزیولوژیک حیوانات برای محافظت در برابر عفونت‌ها و حفظ محیط داخلی بدن‌شان است (Gonzalez-Silvera et al. 2018). دستگاه ایمنی ماهی از دو بخش ذاتی (Innate) و اکتسابی (Adaptive) تشکیل شده و بیشتر بر ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) متکی است (فانیدی و همکاران، ۱۳۹۳). یکی از بخش‌های مهم دستگاه ایمنی ذاتی در ماهی‌ها ایمنی موکوس است (Subramanian et al. 2007). در واقع، موکوس پوست ماهیان به‌عنوان نخستین سد دفاعی ماهی، به‌دلیل ترشح و جایگزینی مداوم مانع از تثبیت انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا بر روی سطوح خارجی بدن ماهی می‌شود (Adel et al. 2014). اجزای موجود در موکوس شامل لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان (عامل مکمل)، لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش‌دهنده C و دیگر پروتئین‌های ضد باکتری است که هر کدام به‌نحوی در جهت افزایش فعالیت دستگاه ایمنی

ماهی ایفای نقش می‌کنند (Subramanian et al. 2007).

استفاده از جیره‌های مناسب و متعادل نیز از مهم‌ترین بخش‌های زیستی برای رشد مناسب و سلامت ماهی بوده و بیش‌ترین هزینه‌های مربوط به آبرزی‌پروری را به خود اختصاص می‌دهد (Jauncey, 1992). تنظیم و افزایش کارایی دستگاه ایمنی در ماهیان از طریق دستکاری جیره‌های غذایی، ابزاری قدرتمند و مؤثر برای حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات است (فانیدی و همکاران، ۱۳۹۳). حتی تحقیقات نشان داده است که علاوه بر انتخاب ژنتیکی، بعضی از عوامل غیرژنتیکی مانند غلظت اسیدهای آمینه در جیره غذایی می‌توانند ظهور ژن‌های مسئول پاسخ‌های ایمنی را از طریق ایجاد تغییر در میزان بلوغ دستگاه ایمنی و همچنین میزان پادتن تولید شده در برابر عفونت‌ها را تغییر دهند (Klasing, 2007). به-طوری‌که Zuo و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه بر روی *Larmichthys crocea* مشاهده کردند که وضعیت دستگاه ایمنی و مقاومت به بیماری با افزودن اسیدآمینه آرژنین (به میزان ۱ یا ۲٪) به جیره، بهبود یافت. همچنین، ماهیان تغذیه شده با جیره‌هایی که از نظر اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره امگا ۳ (HUFA n-3) کمبود داشتند، در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غنی از این اسیدهای چرب مقاومت کم‌تری نسبت به عوامل بیماری‌زا از خود نشان دادند (Kiron et al. 1995).

Sheldon و Blazer (۱۹۹۱) نیز دریافتند که فعالیت ضد باکتریایی ماکروفاژها (بیگانه‌خوارها) در گربه‌ماهیان کانالی (*Ictalurus punctatus*) تغذیه شده با جیره غنی از HUFA n-3 به‌طور معنی‌دار افزایش یافت.

ماهی زبرا (*Danio rerio*) از یک سو به‌علت رنگ‌بندی و خطوط زیبای روی بدن، شکل بدن و ارزش اقتصادی (Ghosh et al. 2007) و از سوی دیگر به‌دلیل این‌که در سال‌های اخیر به‌عنوان مدلی برای سنجش سریع عملکرد ژن‌ها و فعالیت‌های زیستی مولکول‌های آلی مطرح شده است، دارای اهمیت ویژه‌ای است (Zon, 2005) و بر اساس طبقه‌بندی علمی متعلق به رده شعاع‌بالگان، راسته کپورماهی شکلان، خانواده کپورماهیان و جنس *Danio*

درجه سانتی‌گراد آب‌گیری شده بودند، نگهداری شدند. در این پژوهش با استفاده از اجزای غذایی (جدول ۱) که میزان پروتئین، چربی و انرژی آن‌ها با استفاده از جداول استاندارد تعیین شد، ۹ جیره هم انرژی (۳۰۰۰ kcal/kg) با سطوح مختلف پروتئین خام (۳۰، ۳۵ و ۴۰٪) و چربی خام (۴، ۸ و ۱۲٪) (جدول ۱) تنظیم شد و بچه ماهیان در سه تکرار تغذیه شدند (جیره تجاری ماهی زبرا بر اساس وزن تر شامل ۵۵٪ پروتئین و ۲۱٪ چربی است). برای ساخت جیره‌های غذایی آزمایشی، ابتدا مواد اولیه آسیاب شده، سپس توسط الک ۱۰۰ میکرونی الک شدند تا نمونه به صورت پودری و همگن شود. مواد غذایی بجز روغن به مدت ۱۵ دقیقه با یکدیگر ترکیب، سپس روغن به مخلوط اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر با یکدیگر ترکیب و سپس مقداری آب (۵۰۰ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم)، به مخلوط حاصل اضافه شد، تا به صورت خمیر نرم و شکل‌پذیر تبدیل شود (Akrami, 2006)، و پس از عبور از چرخ گوشت چشمه ریز، به صورت رشته‌ای در آمده، رشته‌های خارج شده روی سینی گسترده و در دمای اتاق خشک شدند. غذاهای ساخته شده تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری، و در زمان استفاده به اندازه دهان ماهی خرد و به بچه‌ماهیان داده شدند.

است (Haji Aghaei et al. 2009) و در ۲ تا ۴ ماهگی به بلوغ جنسی می‌رسد (Wilson, 2012). با توجه به اهمیت ماهی زبرا و نیز اینکه تاکنون تحقیقی درباره تأثیر میزان پروتئین و چربی جیره بر ایمنی موکوس پوست ماهیان انجام نشده است، لذا این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی زبرا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از اوسط آبان تا اواسط اسفند ماه ۱۳۹۶، در آزمایشگاه آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. برای انجام آزمایش، تعداد ۱۳۵ قطعه بچه‌ماهی دو ماهه زبرا خریداری و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲ هفته در آکواریوم-هایی نگهداری و با غذای تجاری بیومار تغذیه، سپس تفکیک جنسیت شده و با نسبت جنسی ۲ ماده به ۳ نر به صورت گروه‌های ۵ تایی با میانگین زی‌توده (\pm انحراف معیار) $1/23 \pm 0/02$ گرم در ۲۷ عدد آکواریوم که هر آکواریوم با ۲۰ لیتر از آب تمیز با pH در حد خنثی و دمای ۲۶ تا ۲۸

جدول ۱ اقلام غذایی (بر اساس % جیره) و جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش.

جیره‌ها	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	جیره ۴	جیره ۵	جیره ۶	جیره ۷	جیره ۸	جیره ۹
اقلام غذایی									
آرد گندم	۸/۱۴	۴۳/۸۹۲	۱۵/۹۰۷	۷/۵۸۸	۱۷/۷۸۸	۱۸/۹۳	۰/۰۵۵	۹/۱۴۴	۱۸/۲۴۳
آرد سویا	۲۵/۰۶۸	۱/۵۰۶	۶/۳۰۶	۳/۳۹۱	۹/۲۲	۸/۹۷	۰/۲۴	۲۳/۴۹۱	۱/۰۹۶
آرد ذرت	۱/۳۳۴	۴/۸۷۷	۰/۶۶۳	۱/۱۳	۱۱/۸۵۸	۴/۷۸۵	۰/۰۳۲	۶/۰۹۶	۰/۳۷۱
آرد جو	۱۸/۰۲۶	۲۳/۰۳	۲۴/۰۰۶	۶/۳۲۳	۱۳/۸۸۷	۶/۰۱۲	۰/۰۴۶	۱۳/۷۳۶	۱۷/۵۶۶
بذر کتان	۱۰/۵۱	۱/۹۰۳	۳۴/۰۶۷	۱۴/۵۶۹	۴/۸۵۵	۳۵/۹	۳۰/۵۱۶	۵/۳۷۹	۱۰/۷۴۴
پودر ماهی	۹/۹۱۵	۲۵/۲۶۲	۵/۳۹۱	۳۱/۹۵۴	۲۹/۱۶۳	۱۱/۹۳۲	۳۴/۴۱۲	۲۸/۸۵۴	۳۹/۷۵۲
روغن آفتابگردان	۰/۰۳۵	۰/۹۸۶	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۱/۱۳۸	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۱/۱۲۶	۱/۱۲۹
روغن ذرت	۰/۰۱۷	۲/۳۵۴	۸/۱۵۷	۰/۰۰۸	۱/۴۳۲	۶/۲۷۷	۰/۰۰۰۲	۰/۷۳۶	۲/۱۰۸
روغن کانولا	۰/۱۰۸	۰/۰۲	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۰/۱۲۳	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۰/۳۱۴	۰/۰۱۵
روغن ماهی	۰/۱۳۳	۰/۲۶۷	۰/۲۴۹	۰/۰۷۹	۰/۶۸۱	۰/۰۷	۰/۰۰۴	۰/۷۵۴	۳/۹۷۶
نشاسته	۲۱/۷۱۴	۱/۹۰۳	۰/۰۰۲	۲۹/۹۲	۴/۸۵۵	۰/۵۸۸	۲۹/۶۹۴	۵/۳۷۹	۰
لسیتین	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی ^۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی ^۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
منوکلسیم فسفات	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
پروتئین خام (%)	۲۵	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵	۳۵
چربی خام (%)	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲
کربوهیدرات خام (%)	۵۶	۵۸	۵۰	۵۰	۴۳	۳۶	۳۶	۴۴	۲۹

۱- هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس ویتامینی حاوی: ۱۶۰۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰۰ IU ویتامین D₃، ۳۰ گرم ویتامین E، ۱۰۰ گرم تیامین، ۸ گرم ریبولوین، ۸ گرم پیریدوکسین، ۳ گرم اسید فولیک، ۰/۰۱ گرم سیانوکوبالامین، ۱۰۰ گرم ویتامین C، ۱۰ گرم ویتامین K₃، ۱۰ گرم بیوتین، ۲۰ گرم BHT و ۱۰۰ ویتامین اینوزیتول است.

۲- هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس معدنی حاوی: ۲۰ گرم آهن، ۶۰ گرم روی، ۴۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۲۰۰ میلی گرم کبالت، ۲ گرم مس، ۴۰ گرم منگنز و ۴۰۰ میلی گرم ید است.

جمع آوری موکوس

در انتهای دوره جمع آوری موکوس با استفاده از روش توصیه شده توسط Roosta و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور، غذادهی ماهیان ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری قطع شد. ۵ عدد ماهی از هر آکواریوم پس از بیهوشی (با اسانس گل میخک با غلظت ۵۰ ppm) با استفاده از دستکش‌های استریل به درون کیسه‌های پلاستیکی زیپ پلاست حاوی ۵۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار منتقل شدند. پس از گذشت ۳ دقیقه، ماهیان به آکواریوم‌های مجهز به اکسیژن مناسب منتقل شدند. موکوس جمع‌آوری شده با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به میکروتیوب‌های ۱/۵ mL منتقل و برای بررسی‌های بیشتر در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل

بر اساس روش پیشنهاد شده، منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی استفاده شد (Adel et al. 2014). اندازه‌گیری بعد از اضافه کردن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. با انتقال جذب نوری به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

میزان آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس

با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۰۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه محاسبه شد.

محاسبه فعالیت لیزوزیم

بر اساس روش پیشنهاد شده توسط Esteban (۲۰۱۲) انجام شد. در این روش محاسبه لیزوزیم به روش کدورت-سنجی و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای این کار از باکتری لیوفیلیزه *Micrococcus lyzodeikticus* حل شده در بافر فسفات پتاسیم به عنوان سوبسترا استفاده شد. جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات پتاسیم) در طول موج ۴۵۰ نانومتر و به مدت ۱۰ دقیقه، اثر کاهشی یاخته‌های میکروکوکوس لیزودیکتیکوس ثبت شد.

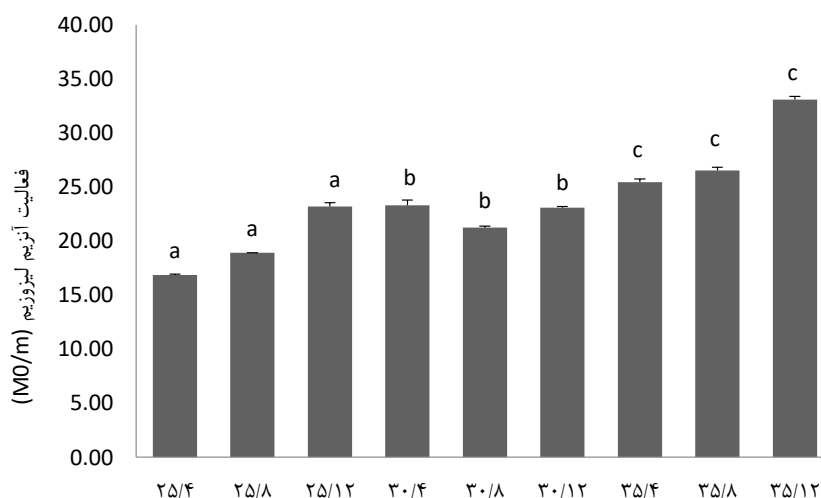
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. آزمون آماری داده‌ها با تجزیه واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) انجام و داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵٪ با یکدیگر مقایسه شدند. کلیه آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

نتایج

در این بخش، نتایج به دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز و پروتئین کل تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره آورده شده است.

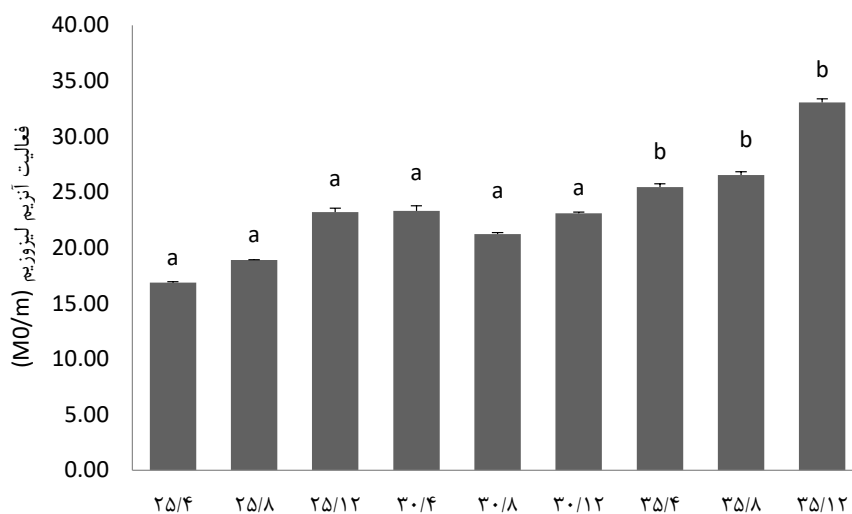
بر اساس این نتایج، با افزایش سطح پروتئین فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست شاخص افزایش یافت، به طوری که در سطح ۳۵٪ نسبت به سطوح ۳۰ و ۲۵٪ و در سطح ۳۰٪ نیز نسبت به ۲۵٪ این افزایش معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$).



شکل ۱ مقایسه میانگین (\pm انحراف معیار) فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس ماهی زبرا (*Danio rerio*) در سطوح مختلف پروتئین جیره پس از ۴ ماه پرورش. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی داری بین تیمارها هستند ($p < 0.05$).

سطح ۱۲٪ نسبت به سطوح ۸ و ۴٪ معنی دار بود ($p < 0.05$).

بر اساس نتایج، تأثیر سطوح مختلف چربی جیره که در شکل ۳ آورده شده است، افزایش سطوح چربی جیره نیز باعث افزایش میزان فعالیت لیزوزیم شد. این افزایش در



شکل ۲ مقایسه میانگین (\pm انحراف معیار) فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس ماهی زبرا (*Danio rerio*) در سطوح مختلف چربی جیره پس از ۴ ماه پرورش. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی داری بین تیمارها هستند ($p < 0.05$).

۳۵٪ نسبت به ۳۰ و ۲۵٪ و در سطح ۳۰٪ نسبت به ۲۵٪ این افزایش معنی دار بود ($p < 0.05$).

نتایج حاصل از میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس ماهی زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف چربی در جدول ۲ آمده است. با افزایش پروتئین جیره، پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی افزایش یافت، به طوری که در سطح

جدول ۲ مقایسه میانگین (± انحراف معیار) پروتئین محلول و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس ماهی زبرا (*Danio rerio*) در سطوح مختلف چربی جیره پس ۴ ماه پرورش.

جیره‌ها	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	جیره ۴	جیره ۵	جیره ۶	جیره ۷	جیره ۸	جیره ۹
پروتئین محلول (g/L)	۰/۶ ± ۰/۰۸ ^a	۰/۳۱ ± ۰/۰۱ ^a	۲/۳۱ ± ۰/۰۵ ^a	۲/۱۱ ± ۰/۰۱ ^a	۲/۶۸ ± ۰/۰۹ ^a	۳/۰۳ ± ۰/۱ ^a	۴/۲۵ ± ۰/۰۸ ^b	۴/۴۹ ± ۰/۴۶ ^b	۶/۶ ± ۰/۲۷ ^b
آنزیم آلكالین فسفاتاز قلیایی (IU/L)	۴۶ ± ۰/۰ ^a	۴۸ ± ۰/۴۶ ^a	۵۵/۴ ± ۳/۶۸ ^a	۵۸/۳ ± ۲/۳ ^a	۶۰ ± ۰/۹۲ ^a	۷۱/۱ ± ۱/۳۸ ^b	۸۶/۶۲ ± ۲/۷۶ ^b	۸۶/۳۹ ± ۰/۷۶ ^b	۱۱۶/۲ ± ۴/۴۱ ^b

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها هستند ($P < 0/05$).

Lee (۲۰۱۴) با بررسی تأثیر اسید آمینه ایزولوسین بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی در ماهی کفشک (*Paralichthys olivaceus*) مشاهده کردند که افزودن ۲٪ از این اسید آمینه به جیره باعث افزایش ایمنی ذاتی شد. Lin و Zhou (۲۰۰۶) در پژوهشی نشان دادند که گلوتامین جیره، شاخص‌های رشد و محتوای پروتئین روده کپور Jian را بهبود بخشید. همچنین با افزایش پروتئین جیره ماهیان کپور آینه‌ای (*Cyprinus carpio*) نیز میزان فعالیت لیزوزیم افزایش یافت (Huang et al. 2015).

هم راستا با این تحقیقات در پژوهش حاضر نیز با افزایش سطوح پروتئین و چربی جیره میزان فعالیت لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و پروتئین محلول کل در موکوس که از مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی موجود در آن بوده و نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهیان دارند، افزایش معنی‌داری یافتند. علت آن را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که چون پاسخ ایمنی اولیه در برابر عامل بیماری‌زا به شدت سبب افزایش سوخت و ساز می‌شود و این مرحله در میزان مقاومت ماهی در برابر بیماری نقش حیاتی دارد و اولویت نیازهای سوخت و سازی ماهی به سمت مواد مغذی مورد نیاز دستگاه ایمنی تغییر می‌کند. بنابراین، در صورت کمبود این مواد، از یک سو کار دستگاه ایمنی مختل خواهد شد و از سوی دیگر سبب ضعف شدید بدنی به دلیل مصرف کامل این مواد توسط دستگاه ایمنی شده و مقاومت ماهی نیز از دست خواهد رفت. بنابراین، تنظیم و افزایش کارایی دستگاه ایمنی در ماهیان از طریق دستکاری جیره‌های غذایی برای حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات مؤثر است.

به‌طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که افزایش پروتئین (۳۵٪) و چربی (۱۲٪) جیره باعث بهبود ایمنی موکوس پوست ماهی زبرا شده است. بنابراین، با توجه به این‌که تاکنون تأثیر این دو عامل بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست (فعالیت لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و پروتئین محلول) ماهیان بررسی نشده بود، تحقیق حاضر می‌تواند آغازی برای بررسی تأثیر سطوح و نیز منابع مختلف تأمین‌کننده پروتئین و چربی جیره بر این شاخص‌ها در ماهیان مختلف به‌خصوص ماهیان اقتصادی باشد.

منابع

بر اساس نتایج، با افزایش چربی جیره، پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی افزایش یافت. این افزایش در سطح ۱۲٪ نسبت به سطوح ۸ و ۴٪ معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

بحث

تعیین سطح بهینه پروتئین و چربی از نظر اقتصادی، تغذیه‌ای، زیست محیطی و ایمنی دارای اهمیت بالایی در آبی-پروری هستند، به طوری که در مطالعه حاضر افزایش چربی جیره در سطح ۱۲٪ و پروتئین در سطح ۳۵٪ بهترین عملکرد ایمنی را در بچه‌ماهیان زبرا تا مرحله رسیدگی جنسی به همراه داشتند. تغذیه یک عامل پیچیده است که دستگاه ایمنی را از زوایای مختلف متأثر می‌کند. مواد مغذی باید تأمین‌کننده کمینه نیازهای دستگاه ایمنی ماهی بوده تا این دستگاه بتواند وظایف خود را به‌نحو مطلوب انجام دهد (قائدی و همکاران، ۱۳۹۳).

در این راستا، تحقیقات متعددی تأثیر مثبت پروتئین و چربی جیره بر بهبود ایمنی ذاتی ماهیان را نشان داده‌اند، از جمله Yildirim-Aksoy و همکاران (۲۰۰۹) با افزودن ۳ تا ۶٪ چربی به جیره گربه‌ماهی آفریقایی مشاهده کردند که فعالیت لیزوزیم سرم به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. همچنین، در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌هایی که از نظر n-3 HUFA کمبود داشتند، در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با این اسیدهای چرب، حساسیت بیشتری نسبت به عوامل بیماری‌زا مشاهده شد (Kiron et al. 1995). Kiron و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش فعالیت باکتری‌کشی و گلبول‌های سفید را در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی روغن کتان گزارش کردند. در تحقیق دیگری، فعالیت لیزوزیم در ماهیان باس مخطط هیبرید (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) تغذیه شده با جیره‌هایی که به آن‌ها ۱ یا ۲٪ آرژنین و ۱٪ گلوتامین اضافه شده بود، به‌طور معنی‌دار نسبت به دیگر تیمارها افزایش یافت (Cheng et al. 2010). افزودن اسید آمینه آرژنین نیز به جیره گربه‌ماهیان کانالی، بازماندگی آن‌ها را در مواجهه با باکتری ادواردزیلا ایکتالوری افزایش داد (Buentello and Gatlin, 2001). Rahimnejad و

قائدی، ع.، حسین‌زاده صحافی، ح.، زرغام، د. ۱۳۹۳. نقش تغذیه در افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهیان. آبریان زینتی ۱: ۲۸-۲۱.

- Adel, M., Safari, R., Nematolahi, A., Yeganeh, S., Ahmadvand, S.H. 2014. The effect of different levels of prebiotic GroBiotic®-A on antibacterial activity and some immune indicators of the mucus of young cultured elephant fish *Huso huso* (Linnaeus). *Journal of Aquaculture* 3: 99-110.
- Akrami, R. 2006. The effects of inulin as a prebiotic on the growth and intestinal microflora of baby elephant fish (*Huso huso*). PhD thesis, Tehran Azad University of Science and Research. 120 p.
- Barton, B.A., Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-26.
- Buentello, J.A., Gatlin III, D.M. 2001. Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 13: 194-201.
- Cheng, Z., Gatlin, D., Buentello, A. 2012. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 362-363: 39-43.
- Esteban, M.A. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *Fish Immunology* 1: 1-29.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female live-bearing ornamental fish. *Aquaculture Research* 38: 518-526.
- Gonzalez-Silvera, D., Herrera, M., Giráldez, I and Ángeles, Esteban, M. 2018. Effects of the Dietary Tryptophan and Aspartate on the Immune Response of Meagre (*Argyrosomus regius*) after Stress. *Fishes*
- Haji Aghaei, R., Bagher Zadeh, Z., Zare, B., Faramarzi, M., Shahverdi, A.R. 2009. Zebrafish: technology for discovery and evaluation of natural compounds. *Quarterly Journal of Medicinal Plants* 8: 14-24.
- Huang, J, Xu, Q. Chang, Y. 2015. Effects of temperature and dietary protein on gene expression of HSP70 and Wap65 and immunity of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research* 46: 2776-2788.
- Jauncey, K. 1992. The Effect of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture* 27: 43-54.
- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi T., Watanabe, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A: 361-367.
- Kiron, V., Thawonsuwan, J., Panigrahi, A., Scharsack, J.P, Satoh, S. 2011. Antioxidant and immune defenses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquaculture Nutrition* 17: 130-140.
- Klasing, K.C. 2007. Nutrition and the immune system. *Gordon Memorial Lecture. British Poultry Science* 48: 525-537.
- Lin, Y., Zhou, X.Q. 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256: 389-394.
- Mandal, B., Mukherjee, A., Banerjee, S. 2010. Growth and pigmentation development efficiencies in fantail guppy (*Poecilia reticulata*) fed with commercially available feeds.

- Agriculture. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1: 1264-1267.
- Pourdavood, M., Sajadi, M., Bahri, A. 2008. Investigating the effects of diets containing *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the growth, survival and resistance to environmental stress of Severum fish (*Heros severus*). *Scientific Journal of Aquatics and Fisheries* 1: 23-31.
- Rahimnejad, S. Lee, K.J. 2014. Dietary Isoleucine Influences Non-Specific Immune Response in Juvenile Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 853-862.
- Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Hoseinifar, S.H. and Vakili, F. 2014. Effect of different level of *Lactobacillus acidophilus* on antimicrobial and some immunomucosal parameters of tiger fish (*Puntius tetrazona*). *Journal of Aquatic Ecology* 3: 13-20.
- Sheldon, W.M. Blazer, V.S. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel cat fish macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health* 3: 87-93.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N. W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148B: 256-263.
- Tissera, K. 2012. The Global Ornamental Fish Industry: An outlook on the First Decade of the New Millennium. International Conference on the Global Ornamental Fish Industry Way Forward. Cochin, Kerala, India.
- Wilson, C. 2012. Aspects of larval rearing. *The Laboratory on International Law and Regulation* 53: 169-178.
- Yildirim-Aksoy, M, Lim. C, Shelby, R.H. Klesius, P.H. 2009. Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 76-86.
- Zon, L.I., Peterson, R.T. 2005. In vivo drug discovery in the Zebra fish. *Natural Review Drug Discovery* 4: 35- 44.
- Zuo, R., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Xu, H., Liufu., Z, Zhang, Y. 2012. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Fish & Shellfish Immunology* 32: 249-258.