مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

تأثیر رادیوواکسن ضد بیماری انگلی لکه سفید بر ترکیب لاشه در ماهی قزل آلای رنگین کمان پس از مواجه‌سازی تجربی با انگل زنده

میلاد اکبری[۱و۲]، مرضیه حیدریه[۱*]، وحید تقی‌زاده[۲]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۲]، مهدی بهگر[۱]، سعید مودی[۱]، غلامرضا شاه‌حسینی[۱]

۱. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای
۲. دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نویسنده مسئول: mheidarieh@nrcam.org

چکیده: اخیراً با توجه به محدودیت روزافزون ذخائر آبزیان و منابع آبی، آبزی‌پروری به روش پرورش متراکم و فوق متراکم رو به گسترش می‌باشد. انگل ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس شایع‌ترین انگل در ماهیان آب شیرین است. استفاده از مواد شیمیایی برای درمان زمانی مؤثر است که انگل در مرحله فاز آزاد زندگی باشد؛ چرا که در بقیه مراحل زندگی، توسط کیست اطراف خود محافظت می‌گردد. استفاده از واکسن برای پیشگیری از این بیماری بهترین گزینه است. در این تحقیق اثر رادیوواکسن بر ترکیب لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. لاشه ماهیان مواجه شده با انگل زنده، در مدت یک و ۲ هفته پس از مواجه‌سازی، دارای درصد خاکستر بالاتری نسبت به گروه‌های واکسینه شده و به خصوص گروه کنترل منفی بود. همچنین آنالیز ترکیبات شیمیایی لاشه ماهیان گروه کنترل منفی درصد چربی بالاتری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند. می‌توان در آخر این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که گروه‌های ایمن‌زا شده با واکسن غیرفعال (پرتودیده و فرمالینه) و نانوذره آلژنیک اسید در مقابل انگل ایک نسبت به گروه کنترل مثبت به خوبی مقاومت نشان داده‌اند؛ که مصرف میزان بیشتر چربی لاشه و به دنبال آن کاهش معنی‌دار خاکستر لاشه که دال بر رشد و نمو بیشتر انگل در بدن ماهیان این گروه است تأیید قوی بر این نتیجه می‌باشد.

واژگان کلیدی: رادیوواکسن، قزل‌آلای رنگین کمان، ایکتیوفتریوس مولتی فلیس، ترکیبات لاشه

Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* radiovaccine on rainbow trout body biochemical composition after live parasite challenge

Milad Akbari[1&2], Marzieh Heidarieh[1], Vahid Taghizadeh[2], Abdolmajid Hajomoradloo[3], Mehdi Behgar[1], Saeed Moodi[1], Gholamreza Shahhoseini[1]
1. Nuclear Science and Technology Research Institute
2. Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources
*mheidarieh@nrcam.org

Abstract: The overexploitation harvests of natural fisheries has led to the rapid development of intensive and semi-intensive aquaculture methods through which man can supplement its ever-increasing food requirements. *Ichthyophthirius multifiliis* is one of the major parasites in fresh water fishes that cause heavy mortality especially intensive (recirculation) system. It is difficult to control using chemotherapy after the parasite penetrates into fish skin and gills. Vaccination against the parasite is an alternative to chemical treatments to prevent Ich mortality. In the present study, we aim to study the efficacy of inactivated and live trophont on rainbow trout body biochemical composition. Statistical analysis showed significant decrease among all of immunized groups in terms

of lipid to negative control group ($p<0.05$). It is quite possible that the parasite utilizes the lipid content for the development of musculature. While, lowest and higher level of ash was shown in negative control and positive control, respectively, at first and second week after challenge. In the present study the increase in ash content can be attributed to the decrease of fat in fish tissue because of parasite musculature development. Therefore, the irradiated inactivated *Ichthyophthirius multifilis* trophont can be used to immunize rainbow trout against Ichthyophthirius multifilis.

Keywords: Radiovaccine, Rainbow trout, *Ichthyophthirius multihilis*, Proximate analysis.

مقدمه

مصرف آبزیان در دهه‌های اخیر به دلیل افزایش جمعیت و رویکرد عمومی به مصرف غذاهای حاصل از منابع آبزی در حال افزایش است. این امر موجب شده است تا بهره‌برداری از ذخائر آبزیان از دریا و آب‌های داخلی به حدی بالا رود که آنها را با خطر نابودی مواجه سازد[۱]. با توجه به محدودیت روزافزون ذخائر آبزیان و منابع آبی، آبزی‌پروری به روش پرورش متراکم و فوق متراکم رو به گسترش می‌باشد. اما لازم به ذکر است که درمان شیمیایی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در سیستم‌های پرورشی متراکم و فوق متراکم آبزیان به علت اثرات منفی فراوان از جمله مهار سیستم ایمنی، باقی ماندن در بافت‌ها و خطر برای بهداشت انسانی [۲، ۳، ۴]، افزایش مقاومت پاتوژن‌ها در مقابل بیماری[۵] و اثرات مخرب محیط زیست [۶] مورد انتقاد بوده و به همین علت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در اروپا، آمریکا و دیگر کشورها به شدت محدود گردیده است [۷].

به همین منظور، در جهت کاهش و یا اجتناب از استفاده از این مواد در آبزی‌پروری واکسن‌ها به عنوان جایگزینی مؤثر در کنترل بیماری‌های مختلف در نظر گرفته می‌شوند[۵، ۸، ۹]. طبق تحقیقات صورت گرفته انگل ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس (*Ichthyophthirius multifiliis*) شایع‌ترین انگل در ماهیان آب شیرین می‌باشد. این انگل در سیستم‌های پرورش متراکم و فوق متراکم مشکل‌ساز بوده و به سرعت شیوع می‌یابد و می‌تواند گاهی تا ۱۰۰٪ تلفات ایجاد کند[۱۰]. استفاده از مواد شیمیایی برای درمان، علاوه بر معایب فوق، زمانی مؤثر واقع می‌شود که انگل در مرحله فاز آزاد زندگی (تومونت و ترونت) باشد؛ چرا که در بقیه مراحل زندگی، توسط کیست اطراف بدن محافظت می‌گردد [۶]. با توجه به همین دلایل استفاده از واکسن برای پیشگیری از این بیماری مورد توجه قرار گرفته است [۱۱]. بنابراین هدف از این تحقیق استفاده از رادیوواکسن (انگل غیرفعال شده توسط پرتو گاما) ضد این بیماری انگلی و بررسی اثر آن بر ترکیب لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- تهیه تروفونت انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس

به منظور داشتن تروفونت‌های کافی به منظور پرتوتابی و همچنین برای انجام مرحله مواجه‌سازی تجربی، ابتدا تعدادی انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس فعال از ماهیان با آلودگی سنگین به انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس تهیه و آنها را به آکواریومی حاوی ۵۰ عدد ماهی قزل‌آلا رنگین کمان اضافه نموده که در این صورت شرایط برای رشد انگل فراهم می‌شود. پس از آلودگی شدید ماهیان، توسط الک دارای چشمه ۲۰۰ میکرونی تروفونت‌ها جمع‌آوری می گردند.

۲-۲- پرتودهی انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس

پرتوتابی تروفونت‌های جمع‌آوری شده با دز ۳۰ کیلوگری به وسیله سیستم گاماسل نوردین- مدل ۲۲۰ (PX-30 – IssIedovapel) و با نرخ دز ۰/۲۲ گری بر ثانیه با چشمه کبالت ۶۰ به منظور تهیه رادیوواکسن انجام گرفت [۱۲].

۲-۳- غیرفعال‌سازی انگل با استفاده از فرمالین (واکسن غیرفعال فرمالینه)

انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس زنده به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۳ درصد مواجه و سپس با دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ می‌گردد. پس از سانتریفوژ مایع رویی خارج و ۳ مرتبه با ۱ میلی‌لیتر محلول استریل PBS (۰/۱۵ مولار و pH ۷/۴) جستجو داده می‌شود.

۲-٤- آماده‌سازی نانوذرات آلژنیک اسید

ارگوسان تجاری تهیه شده از شرکت شرینگ پلاو با محلول PBS با pH برابر ۷/۲ مخلوط گردید. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور کاملاً سونیکه شد و در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید[۱۳]. نمونه‌ها پس از رسوب در اتانول ۹۶ درصد، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد خشک و سپس آسیاب شدند تا اندازه ذرات به ۵۳-۱۲۵ میکرون رسیدند. پرتوتابی پودر ایجاد شده با دز ۳۰ کیلوگری با سیستم گاماسل (PX-30 – IssIedovapel) و با نرخ دز ۰/۲۲ گری بر ثانیه با چشمه کبالت ۶۰ انجام گرفت [۱۴، ۱۵، ۱۶]. پس از پرتوتابی، نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای آزمایش‌های بعدی نگه‌داری شد.

۲-۵- طرح آزمایش

در این تحقیق هفت تیمار و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شده است. تیمارها شامل تیمار ماهیان مواجه شده با ۱۰۰ عدد انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس غیرفعال شده با پرتو گاما به عنوان رادیوواکسن (گروه ۱)، تیمار ماهیان مواجه شده

با ۱۰۰ عدد انگل ایکتیوفتریوس مولتی فلیس غیرفعال شده با پرتو گاما به همراه ادجوانت نانوذره آلژنیک اسید (گروه ۲)، تیمار ماهیان مواجه شده با نانوذرات آلژنیک اسید به تنهایی (گروه ۳)، کنترل مثبت که تنها ۱۰۰ عدد انگل فعال را دریافت نموده‌اند (گروه ۴)، واکسیناسیون ماهیان با ۱۰۰ عدد انگل به عنوان واکسن غیرفعال فرمالینه (گروه ۵)، واکسیناسیون ماهیان با ۱۰۰ عدد انگل به عنوان واکسن غیرفعال فرمالینه به همراه ادجوانت، نانوذره آلژنیک اسید، (گروه ۶) و کنترل منفی (گروه ۷) می‌باشد. برای این منظور ۱۰۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۳۰ تا ۴۰ گرمی بین ۲۱ آکواریوم تقسیم می‌شوند (۵ ماهی در هر آکواریوم). همه گروه‌ها به جزء گروه کنترل منفی (شاهد) پس از ۱۰ روز دز یادآور واکسن را دریافت نمودند. سپس همه گروه‌های واکسینه شده به جز دو گروه کنترل مثبت و منفی (شاهد) پس از طی ۱۰ روز پس از دومین دز واکسن (یادآور) با ۱۰۰ عدد تروفونت زنده ایکتیوفتریوس مولتی فلیس به طور تجربی مواجه گردیدند. یک هفته و دو هفته پس از عملیات مواجه‌سازی نمونه‌برداری از لاشه ماهی‌ها صورت پذیرفت.

۲-٦- بررسی ترکیبات لاشه

جهت بررسی ترکیبات لاشه شیوه‌های عنوان شده در روش استاندارد مورد آزمایش قرار گرفت. پروتئین خام به روش کجلدال و از طریق تعیین نیتروژن کل و ضرب آن در ضریب ۶/۲۵ محاسبه گردید (۶/۲۵ × درصد نیتروژن = درصد پروتئین). چربی خام از طریق حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به روش سوکسله انجام شد. رطوبت از طریق قرار دادن نمونه در اتوکلاو در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و خاکستر از طریق قرار دادن نمونه در کوره الکتریکی در حرارت ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد[۱۷].

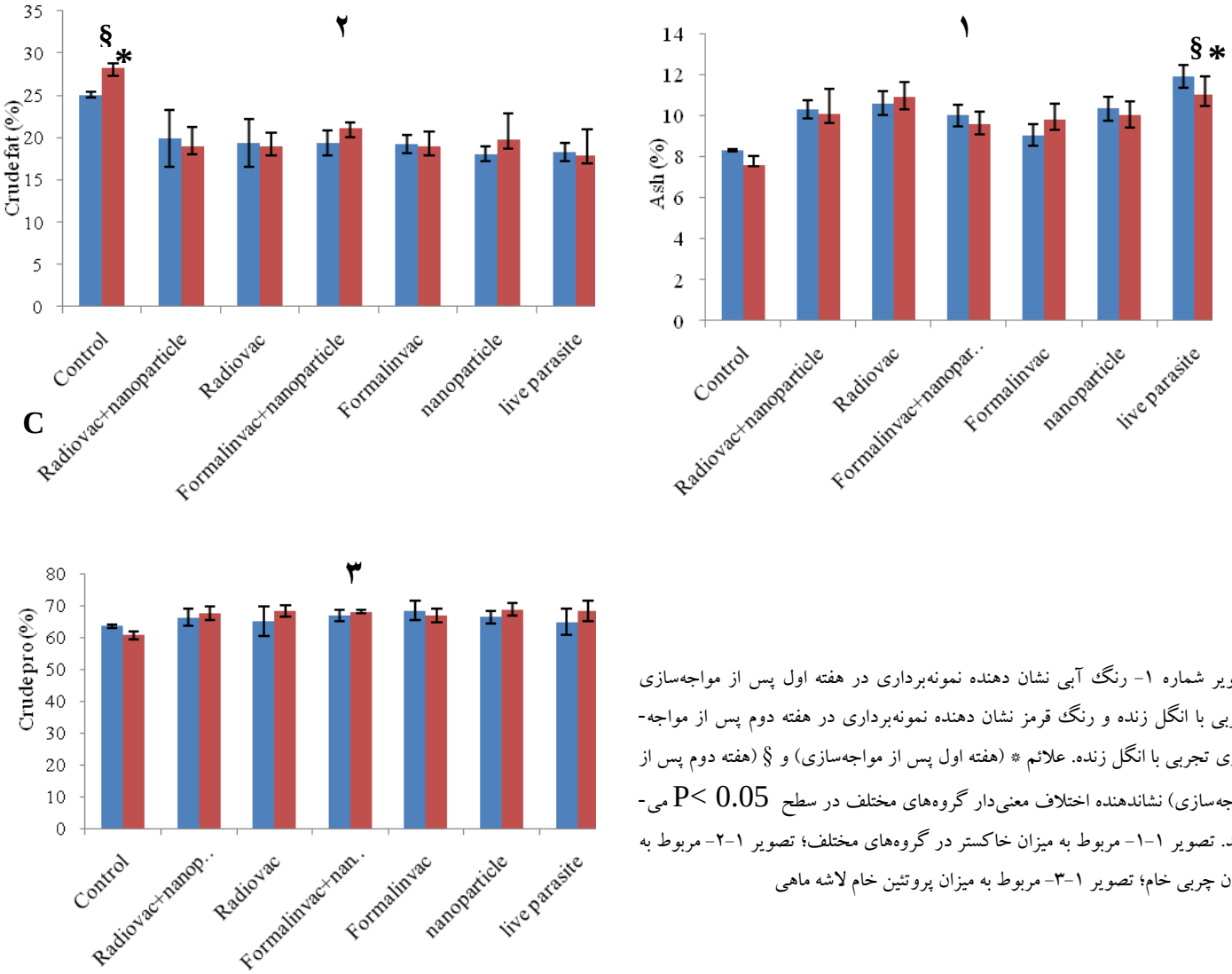
۲-۷- روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف-اسمریوف بررسی و در صورت عدم نرمال بودن، با روش Arcsin می‌گردد. سپس داده‌ها (mean± standard error, SE) با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) آنالیز و آزمون Tukey برای مقایسه بین میانگین تیمارها برای هر تیمار به صورت جدا گانه با نرم‌افزار SPSS با سطح معنی‌داری $P<0.05$ انجام خواهند شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه در گروه‌های مختلف در تصویر شماره ۱ در ذیل به نمایش گذارده شده است. میزان چربی لاشه کاهش معنی‌داری را در گروه کنترل منفی (شاهد) نسبت به سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. کمترین و بیشترین میزان خاکستر

نیز به ترتیب در گروه کنترل منفی (شاهد) و کنترل مثبت در اولین و دومین هفته پس از مواجه‌سازی تجربی با انگل زنده به ثبت رسیده است.



تصویر شماره ۱- رنگ آبی نشان دهنده نمونه‌برداری در هفته اول پس از مواجه‌سازی تجربی با انگل زنده و رنگ قرمز نشان دهنده نمونه‌برداری در هفته دوم پس از مواجه-سازی تجربی با انگل زنده. علائم * (هفته اول پس از مواجه‌سازی) و § (هفته دوم پس از مواجه‌سازی) نشاندهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌های مختلف در سطح $P< 0.05$ می-باشد. تصویر ۱-۱- مربوط به میزان خاکستر در گروه‌های مختلف؛ تصویر ۱-۲- مربوط به میزان چربی خام؛ تصویر ۱-۳- مربوط به میزان پروتئین خام لاشه ماهی

براساس نتایج این تحقیق، لاشه ماهیان مواجه شده با انگل زنده در مدت زمان یک هفته و ۲ هفته پس از عملیات مواجه‌سازی، دارای درصد خاکستر بالاتری نسبت به گروه‌های واکسینه شده و به خصوص گروه کنترل منفی (شاهد) بود. همچنین آنالیز ترکیبات شیمیایی لاشه ماهیان گروه کنترل منفی (شاهد) درصد چربی بالاتری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند. تفاوت ترکیب شیمیایی لاشه یک گونه ماهی به عواملی از جمله تفاوت در سن، جنس، شرایط محیطی و فصل بستگی دارد [۱۸].

آلودگی انگلی باعث کاهش شدید در میزان کربوهیدرات، چربی و پروتئین در لاشه ماهیان می‌شوند[۱۸، ۱۹]. علت کاهش شدید چربی در لاشه ماهیان آلوده به انگل می‌تواند به علت مصرف چربی توسط انگل برای رشد و بقاء باشد[۱۸، ۱۹]. نتایج پروژه ما نیز تأئیدی بر این موضوع است که به جزء گروه کنترل منفی سایر گروه‌هایی که با انگل زنده مواجه (مرحله مواجه-سازی جهت تست ایمن‌زایی واکسن) شده‌اند؛ دچار کاهش شدید در میزان چربی لاشه گردیده‌اند. از طرفی دیگر میزان چربی با خاکستر لاشه رابطه کاملاً معکوس دارد. خاکستر لاشه شامل مواد معدنی باقی‌مانده پس از حذف مواد آلی (چربی، پروتئین و کربوهیدارت‌ها) می‌باشد [۱۷]. افزایش خاکستر لاشه در گروه کنترل مثبت می‌تواند به علت رشد و نمو بیشتر انگل و مصرف بیشتر چربی لاشه و به دنبال آن افزایش خاکستر لاشه باشد. در این پژوهش در مقدار پروتئین خام لاشه، بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. Rameshkumar و همکاران (۲۰۱۳) نیز این نتیجه را با ذکر این مورد که آلودگی انگلی منجر به تغییر معنی‌داری در میزان پروتئین لاشه نمی‌شود، تأئید نموده‌اند [۱۹]. در آخر براساس تمام موارد ذکر شده در بالا می‌توان به این نکته اشاره نمود که گروه‌های ایمن‌زا شده با واکسن غیرفعال (پرتودیده و فرمالینه) و نانوذره آلژنیک اسید در مقابل انگل تک یاخته ایکتیوفتریوس مولتی فلیس نسبت به گروه کنترل مثبت به خوبی مقاومت نشان داده‌اند؛ که مصرف میزان بیشتر چربی لاشه و به دنبال آن کاهش معنی‌دار خاکستر لاشه دال بر رشد و نمو بیشتر انگل در بدن ماهیان این گروه تأئید قوی بر این می‌باشد.

منابع

1- J.G. Bell, R.J. Henderson, D.R. Tocher, F. McGhee, J.R. Dick, A. Porter, R.P. Smullen and J.R. Sargent, "Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (Salmo salar) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism", The Journal of nutrition. 132,222(2002).

2- R. Harikrishnan, C. Balasundaram, M.C. Kim, J.S. Kim, Y.J. Han and M.S. Heo, "Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts", Fish & Shellfish Immunology. 27,508-515(2009).

3- R. Harikrishnan, C. Balasundaram, S. Dharaneedharan, Y.G. Moon, M.C. Kim, J.S. Kim and M.S Heo, "Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans",* Aquaculture Research. 40,1170-1181(2009).

4- G.T. Rijkers, A.G. Teunissen, R. Van Oosterom and W.B. Van Muiswinkel, "The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio L.*)", Aquaculture. 19, 177-189(1980).

5- P. Smith, M.P. Hiney and O.B. Samuelsen, "Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning", Annual review of fish diseases. 4, 273-313(1994).

6- M. Cross and R. Matthews, "Ichthyophthirius multifiliis Fouquet (Ciliophora): the location of sites immunogenic to the host Cyprinus carpio (L.)", Fish & Shellfish Immunology. 3,13-24(1993).

7- D.M. Gatlin III, "Nutrition and fish health", Fish nutrition. 671-702(2002).

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

9- D.J. Alderman and T.S. Hastings, "Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance potential for consumer risks", International Journal of Food Science and Technology. 33: 139-155(1998).

10- W.A. Rogers and J.L. Gaines,"Lesions of protozoan diseases in fish", The Pathology of Fishes. 117-141(1975).

11- B. Goven, D. Dawe and J. Gratzek, "Protection of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafmesque, against Ichthyophthirius multifiliis Fouquet by immunization", Journal of Fish Biology. 17, 311-316(1980).

12- M. Heidarieh, M. Hedayati rad, A.R. Mirvaghefi, A. Diallo, Sh. Mousavi, N. Sheikhzadeh and A.A. Shahbazfar, "Effect of gamma-irradiation on inactivation of *Ichthyophthirius multifiliis* trophonts and its efficacy on host response in experimentally immunized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Turkish Journal of veterinary Animal Science. 38, 388-393(2014).

13- S. Peddie, J. Zou and C.J. Secombes, "Immunostimulation in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) following intraperitoneal administration of Ergosan", Veterinary immunology and immunopathology. 86, 101-113(2002).

14- M. Heidarieh, A. Borzouei, S. Rajabifar, F. Ziaie and Sh. Shafiei,"Effects of gamma irradiation on antioxidant activity of Ergosan", Iranian Journal of Radiation Research. 9, 245-249(2012).

15- M. Heidarieh, F. Daryalal, A.R. Mirvaghefi, A.A. Shahbazfar, S. Moodi and H. Heidarieh, "Histopathological alterations induced by irradiated alginic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Journal of applied Ichthyology. 30(3), 543-545(2014).

16- M. Heidarieh, F. Daryalal, A.R. Mirvaghefi, S. Rajabifar, A. Diallo, M. Sadeghi, F. Zeiai, S. Moodi, E. Maadi, N. Sheikhzadeh, H. Heidarieh and M. Hedyati, "Preparation and anatomical distribution study of 67Ga-alginic acid nanoparticles for SPECT purposes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)", NUKLEONIKA. 59(4), 153□159 (2014).

17- AOAC, "Official Methods of Analysis", 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1995).

18- S. Radhakrishnan and N.B. Nair, "Nature of crustacean infestation of fishes along the south-west coast of India; distribution, mode of attachment to the host tissue and incidence and intensity of infestation" Acta Ichthyologica et Piscatoria. 13(2), 93-115 (1983).

19- G. Rameshkumar, S. Ravichandran and K. Sivasubramanian, Invasion of parasitic isopods in marine fishes" Journal of Coastal Life Medicine. 1(2), 88-94 (2013).