

"مقاله پژوهشی"

مقایسه برخی شاخص‌های سرم و موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با تنش شوریسپیده غنی^{۱*}، عبدالمجید حاجی مراد لوی^۱، حامد پاک‌نژاد^۱، مرضیه ابوالفتحی^۱

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۳

چکیده

تحقیق حاضر جهت ارزیابی برخی شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم و موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با تنش شوری صورت گرفت. بدین منظور ۱۸۰ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی پرورشی با میانگین وزن 5.0 ± 0.62 گرم تهیه و به سالن آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه گرگان انتقال یافت. پس از دو هفته سازگاری، آزمایش در قالب ۳ تیمار شامل تیمار آب شیرین (شوری ppt ۰/۲)، تیمار آب لب‌شور (شوری ppt ۷) و تیمار آب شور دریای خزر و (شوری ppt ۱۴) انجام شد (آب دریا از خلیج گرگان تهیه گردید). جهت تعیین شاخص‌های ایمنی ذاتی (پروتئین محلول، آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم) در پاسخ به تنش شوری، نمونه‌برداری از سرم و موکوس پوست در سه بازه زمانی مجزا شامل روز سوم، روز ششم و روز نهم بعد از در معرض قرارگیری با شوری‌های مختلف انجام گرفت. پروتئین تام سرم در شوری‌های ppt ۷ و ppt ۱۴ تا روز سوم پس از تنش شوری، افزایش معنی‌داری داشت و در روزهای ششم و نهم دوباره به حد نرمال قبل از تنش بازگشت. پروتئین محلول موکوس در تیمار ppt ۱۴ نسبت به تیمار شاهد، در روز نهم پس از تنش، افزایش معنی‌داری یافت. میزان آلکالین فسفاتاز سرم در تیمار ppt ۱۴ از ششمین روز مواجهه با تنش تا روز نهم افزایش معنی‌داری در مقایسه با روز سوم و ششم از خود نشان داد ($p < 0.05$). در حالی که در مقایسه با قبل از تنش، این افزایش معنی‌دار نبود. روز نهم آلکالین فسفاتاز موکوس در تیمار ppt ۱۴ افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). میزان لیزوزیم سرم در شوری‌های ۷ و ppt ۱۴ در روزهای ابتدایی مواجهه با تنش شوری، افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0.05$). در شوری ppt ۷، تا روز سوم میزان لیزوزیم موکوس افزایش معنی‌داری یافت. از روز ششم تا روز نهم روند تغییر آن نیز افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). و به مقدار نرمال قبل از تنش بازگشت. در شوری ppt ۱۴ تا روز سوم میزان لیزوزیم موکوس کاهش داشت. این کاهش تا روز ششم نیز ادامه یافت، به طوری که در روز ششم میزان آن در مقایسه با قبل از تنش کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). پس از آن تا روز نهم میزان لیزوزیم موکوس افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0.05$). همچنین مقادیر عددی فعالیت لیزوزیم در موکوس پوست چندین برابر (در برخی تیمارها تا ۳۰ برابر) آن در سرم خون بود. در الگوی پروتئینی سرم، محدوده‌ی باندهای پروتئینی از ۷۰-۲۲ کیلودالتون مشاهده شد. الگوی پروتئینی موکوس در محدوده‌ی ۷۰-۹ کیلودالتون مشاهده گردید. به طوری که تراکم و تعداد باندها نسبت به سرم کمتر بود. در مجموع، تغییرات شوری تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های سرمی و موکوسی و تغییرات الگوی پروتئینی ماهی کپور معمولی داشت. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از سطوح مختلف دیگری از استرس شوری و الکتروفورز دو بعدی و تشخیص باندهای پروتئینی مشاهده شده، پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: تنش شوری، آبی، شاخص‌های موکوس، شاخص‌های سرم، الگوی پروتئینی.

مقدمه

شوری یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که تغییرات آن بقاء، سوخت و ساز و پراکنش ماهیان را طی تکامل تحت تأثیر قرار می‌دهد (Varsamos et al., 2005). استرس شوری می‌تواند مانع بزرگی در جهت تولید ماهیان باشد (حافظ امینی و عریان، ۱۳۸۱). پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیکی اغلب به منظور ارزیابی وضعیت سلامتی ماهیان و نیز شاخص‌های استرس، در ماهیان استفاده می‌شوند. از آنجایی که خون مستقیماً در بسیاری از فرآیندهای سوخت و سازی نقش داشته و منعکس‌کننده تغییرات بدن جانور است، ارزیابی‌های خونی و هورمونی در امر تشخیص وضعیت فیزیولوژیک ماهیان از اهمیت بالایی برخوردار است. فراوان‌ترین ماده حل شده در سرم را گروهی از پروتئین‌های سرم شامل: آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند. از عملکرد عمده این پروتئین‌ها می‌توان به تنظیم فشار اسمزی خون، انتقال ترکیبات داخلی و خارجی مانند اسیدهای چرب آزاد، هورمون‌ها و داروها اشاره کرد (Austin and Macintosh, 1988). پوست ماهیان بخشی از بدن با عملکردهای مختلف بوده که در شرایط طبیعی به عنوان یک سد محدودکننده با نیازهای فیزیولوژیکی بدن ماهی تطابق یافته است (Peyghan and Salamat, 2012). اپیتلیوم پوست ماهی به وسیله لایه موکوسی که توسط سلول‌های جامی شکل ترشح می‌شود، پوشیده می‌شود (Austin and Macintosh, 1988). موکوس اپیدرم حاوی ترکیب‌های مختلف ترشحاتی از جمله: گلیکوپروتئین‌ها، آگلوتین‌ها، لکتین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوانزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، لیزوزیم، پروتئین فاز حاد و

آنتی‌بادی‌های طبیعی می‌باشد که نقش دفاعی مهمی را علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند (Austin and Macintosh, 1988). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است و در حوضه‌های دریای خزر، رودخانه تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد. این ماهی یک گونه استنوهالین آب شیرین است و دمای اپتیمم برای رشد آن حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. ماهی کپور از گونه‌های مهم پرورشی است و تنش شوری باعث کاهش سیستم ایمنی ماهی می‌شود. این تحقیق به منظور تعیین اثرات نامطلوب شوری بر برخی شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس ماهی در طی ۹ روز انجام شد. ذاکر و همکاران (۱۳۹۴)، در مطالعه‌ای فعالیت لیزوزیم سرم خون و موکوس پوست ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) در اکوسیستم آب لب‌شور و آب شیرین را بررسی کردند و دریافتند که بیشترین فعالیت لیزوزیم در آب دریا و کمترین میزان آن در رودخانه مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که سطح لیزوزیم در موکوس پوست بسیار بیشتر از فعالیت آن در خون ماهی سفید است. Subramanian و همکاران (۲۰۰۷)، با بررسی فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز در گروهی از ماهیان آب شور و شیرین، بیان کردند که فعالیت آنزیم لیزوزیم با تغییر شوری آب، تغییر مشخصی را نشان می‌داد. ماهیان دریایی در مقایسه با ماهیان آب شیرین تقریباً دو برابر میزان لیزوزیم بیشتری داشتند مطالعات کمی در زمینه استرس شوری بر شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس صورت گرفته است. Taylor و همکاران (۲۰۰۷)، تغییرات نسبت لیزوزیم موکوس پوست را از آب شیرین به آب شور سنجیدند

موکوس پوست در سه مرحله مجزا شامل روز سوم، روز ششم و روز نهم بعد از در معرض قرارگیری با شوری‌های مختلف انجام گرفت. جمع‌آوری موکوس مطابق با روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷)، انجام شد. پس از مشاهده وضعیت عمومی هر ماهی و اطمینان از سالم بودن آن‌ها، تعداد ۹ ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی صید و با استفاده از محلول گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش و به کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۵ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار منتقل شدند. سپس کیسه‌ها را به آرامی به مدت ۲-۱ دقیقه تکان داده و پس از جمع‌آوری موکوس، ماهی‌ها به مخازن بازیابی برگردانده شدند. نمونه‌های موکوس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای نمونه-برداری از خون ۹ عدد ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمار صید و خونگیری از سیاهرگ دمی با استفاده از سرنگ غیر هپارینه، به مقدار ۲ میلی‌لیتر انجام شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شد (۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) و سرم با استفاده از سمپلر جداسازی و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت پروتئین محلول موکوس هر ماهی با استفاده از روش Lowry (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری شد. فعالیت لیزوزیم به روش کدورت ستجی با استفاده از باکتری *Micrococcus luteus* به عنوان سوبسترا تعیین شد. به‌طور خلاصه، ۲۵۰ میکرولیتر نمونه موکوس به کووت حاوی ۱/۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های *M. luteus* در بافر استات سدیم (۰/۰۲ مولار، pH = ۵/۵) افزوده و کاهش در جذب سلول‌های *M. luteus* به

و با انتقال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از آب شیرین به آب شور نشان دادند که فعالیت لیزوزیم در آب شور افزایش می‌یابد. در این تحقیق، به مقایسه برخی شاخص‌های سرم و موکوس (پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز، لیزوزیم و آنالیز الگوی پروتئینی) ماهی کپور معمولی در مواجهه با شوری پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش از آذرماه تا اسفند ۱۳۹۷ انجام شد. بدین منظور، ۱۸۰ عدد بچه ماهی کپور با میانگین وزن 5.0 ± 0.62 گرم تهیه و به سالن آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافت. پس از دو هفته تطابق با شرایط محیطی، آزمایش در قالب ۳ تیمار شامل تیمار آب شیرین (شوری ppt ۰/۲)، تیمار آب لب‌شور (شوری ppt ۷) و تیمار آب شور دریای خزر (شوری ppt ۱۴)، طی ۹ روز انجام شد (آب دریا از خلیج گرگان تهیه گردید). هر تیمار شامل سه حوضچه حاوی ۶۰ قطعه ماهی با میانگین وزن 0.62 ± 5.0 گرم بود. ماهیان در طی دوره آزمایش ۲ بار در روز با غذای تجاری شرکت فرادانه تغذیه شدند (جدول ۱). پارامترهای کیفی آب از جمله pH (۶/۷ - ۷/۹)، اکسیژن محلول (۷-۹ میلی‌گرم در لیتر) و سختی آب: ۲۱۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم در لیتر دو بار در هفته اندازه‌گیری و در حد قابل قبول برای ماهی کپور معمولی حفظ شدند. هم‌چنین تعویض آب هر یک روز در میان در طی دوره آزمایش صورت گرفت. جهت بررسی شاخص‌های ایمنی ذاتی بچه ماهیان کپور معمولی در پاسخ به تنش شوری، نمونه‌برداری از سرم و

گرفت. همچنین برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون دقیق فیشر Fishers exact test استفاده گردید.

نتایج

پروتئین تام سرم

در روز سوم پس از تنش شوری، روند افزایشی در تیمارها مشاهده شد. به طوری که، در غلظت ۱۴ ppt این روند معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در روزهای ششم و نهم پس از تنش تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. بیشترین میزان پروتئین تام سرم، در روز سوم پس از تنش، در شوری ۱۴ ppt با میانگین $3/52 \pm 0/26$ با تفاوت معنی‌دار و کمترین مقدار آن در روز نهم در همین شوری با میانگین $1/9 \pm 0/27$ مشاهده گردید. در شوری ۰/۲ ppt، میزان پروتئین تام سرم اختلاف معنی‌داری در روزهای قبل از تنش، سوم، ششم و نهم پس از تنش شوری نشان نداد. در شوری ۷ ppt، روند تغییرات تا روز سوم افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). پس از آن تا روزهای ششم و نهم به حد نرمال قبل از تنش شوری برگشت. همچنین در شوری ۱۴ ppt تا روز سوم افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$)، و در روزهای ششم و نهم دوباره به حد نرمال قبل از تنش بازگشت (جدول ۲).

آلکالین فسفاتاز سرم

در روز سوم پس از تنش شوری، مقادیر آلکالین فسفاتاز سرم روند کاهشی داشت. به طوری که، تیمار شاهد بیشترین مقدار را با تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای ۷ و ۱۴ ppt نشان داد ($p < 0/05$). در روز ششم، روند تغییرات پس از شاهد، در تیمار ۷ ppt افزایش و سپس در تیمار ۱۴ ppt کاهش معنی‌داری را

مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. کاهش جذب در دقیقه حداقل باید ۰/۰۰۱ باشد. یک واحد فعالیت آنزیم به صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های *M. luteus* ایجاد می‌کند، بیان می‌شود. فعالیت فسفاتاز قلیایی با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی انجام شد. اختلاف جذب نوری به مدت ۳ دقیقه در فواصل ۱ دقیقه‌ای در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و میزان فعالیت آنزیم مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه شد. الگوی پروتئینی سرم و موکوس بچه‌ماهی کپور با الکتروفورز ژل سدیم دو دوسیل سولفات پلی‌اکریل آمید بر اساس روش (Laemmli 1970) با کمی اصلاحات آنالیز شد.

جدول ۱: آنالیز شیمیایی جیره غذایی مورد استفاده در آزمایش

ترکیبات شیمیایی جیره درصد (%)	
پروتئین	۴۰
کربوهیدرات	۲۷
چربی خام	۷
فیبر خام	۶
خاکستر	۱۰
رطوبت	۱۰

تجزیه تحلیل داده‌ها

در این آزمایش، به منظور تعیین روند تغییرات مقادیر پروتئین در سه مقطع زمانی از تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated Measures ANOVA) و با دو فاکتور شامل فاکتور اول؛ دوره زمانی در سطوح ۳ و ۶ و ۹ روز و تیمار تنش شوری در سه سطح آب شیرین، لب شور و شور دریای خزر انجام

در شوری ۰/۲ ppt، در روزهای نمونه‌برداری پس از تنش اختلاف معنی‌داری نداشت. در شوری ۷ ppt تا روز سوم افزایش معنی‌داری دیده شد ($p < 0/05$). و این افزایش تا روز نهم ادامه یافت، ولی معنی‌دار نبود. در شوری ۱۴ ppt میزان لیزوزیم سرم تا روز سوم افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$). پس از آن تا روز ششم و نهم کاهش یافت. به طوری که، این کاهش در مقایسه با سومین روز معنی‌دار بود (جدول ۴).

پروتئین محلول موکوس

در روز سوم تنش، سطح پروتئین محلول روند افزایشی در تیمارها مشاهده گردید که این تغییرات معنی‌دار نبود. در روز ششم، مقادیر پروتئین محلول، در شوری ۷ ppt در مقایسه با شاهد، کاهش و سپس در شوری ۱۴ ppt افزایش یافت، به طوری که مقادیر آن معنی‌دار نبود. در روز نهم پس از تنش، روند تغییرات افزایشی، به طوری که در تیمار ۱۴ ppt نسبت به تیمار شاهد، این افزایش معنی‌دار بود ($p < 0/05$). حداقل میزان پروتئین محلول، در روز ششم با شوری ۷ ppt با میانگین $0/1 \pm 0/36$ و حداکثر میزان آن در روز نهم و شوری ۱۴ ppt با میانگین $0/07 \pm 1/16$ اختلاف معنی‌داری، مشاهده گردید. شاخص پروتئین محلول موکوس، در تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در شوری ۷ ppt، تغییرات این شاخص معنی‌دار نبود. در شوری ۱۴ ppt نیز همین روند مشاهده شد (جدول ۵).

آلکالین فسفاتاز موکوس

در روز سوم تنش، مقادیر آلکالین فسفاتاز موکوس، در شوری ۷ ppt افزایش، و در ۱۴ ppt کاهش یافت.

نسبت به تیمار ۷ ppt نشان داد ($p < 0/05$). در روز نهم نیز همین روند ابتدا افزایش و سپس کاهش را طی کرد. با این تفاوت که این تغییرات در روز نهم معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار آلکالین فسفاتاز سرم در روز ششم در تیمار ۷ ppt با مقدار میانگین $17/21 \pm 71/68$ و کمترین مقدار آن در روز سوم در تیمار ۱۴ ppt با میانگین $2/3 \pm 31/63$ با تفاوت معنی‌داری از یکدیگر دیده شد. میزان آلکالین فسفاتاز سرم در شوری ۰/۲ ppt اختلاف معنی‌داری را تا روز نهم پس از تنش شوری نشان نداد. در شوری ۷ ppt، میزان آلکالین فسفاتاز سرم تا روز سوم کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). از روز سوم به ششم روند افزایشی معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). پس از آن تا روز نهم روند کاهشی از خود نشان داد. به طوری که، در روزهای ششم و نهم به حد نرمال خود (قبل از تنش) نزدیک شد. در شوری ۱۴ ppt روند تغییرات این شاخص تا روز سوم پس از تنش، کاهش و در روز ششم افزایش یافت. در حالی که این تغییرات معنی‌دار نبود. سپس تا روز نهم افزایش معنی‌داری در مقایسه با روز سوم و ششم از خود نشان داد ($p < 0/05$). در حالی که در مقایسه با قبل از تنش این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۳).

لیزوزیم سرم

در روزهای سوم، ششم و نهم پس از تنش شوری، در هر سه تیمار، میزان لیزوزیم سرم روند افزایشی داشت که این تغییرات، معنی‌دار بود ($p < 0/05$). کمترین میزان آن قبل از تنش و شوری ۰ ppt با میانگین $0/1 \pm 2/6$ ، و بیشترین مقدار آن در روز سوم در تیمار ۱۴ ppt با اختلاف معنی‌داری، معادل با میانگین $0 \pm 21/0$ مشاهده گردید. روند تغییرات این پارامتر

معنی‌داری را از خود نشان نداد. تا روز نهم روند تغییر لیزوزیم موکوس، افزایشی معنی‌داری بود ($p < 0/05$) و به مقدار نرمال قبل از تنش بازگشت. در شوری ۱۴ ppt تا روز سوم میزان لیزوزیم کاهش یافت. این کاهش تا روز ششم نیز ادامه یافت، به طوری که در روز ششم میزان لیزوزیم در مقایسه با قبل از تنش کاهش معنی‌داری ($p < 0/05$) داشت. پس از آن تا روز نهم میزان لیزوزیم افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$) (جدول ۷).

تأثیر شوری و زمان بر آنالیز الگوی پروتئینی سرم

در تیمار آب شیرین، محدوده باندهای پروتئینی، از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون مشاهده شد. در تمام روزهای نمونه‌برداری در تیمار آب شیرین، باندهای پروتئینی مشاهده شده یکسان بود. در وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون باند پرتراکم دیده شد. دو باند پروتئینی خفیف در محدوده‌ی وزنی ۴۱ تا ۵۳ کیلودالتون وجود داشت. باند پروتئینی نسبتاً پرتراکم در محدوده‌ی وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون دیده شد (شکل ۱).

در تیمار آب لب‌شور، دامنه‌ی باندهای پروتئینی قابل مشاهده از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در محدوده وزنی ۲۲ و ۴۱ کیلودالتون، باند پروتئینی قابل مشاهده با تراکم یکسان در هر سه زمان مشاهده گردید. در محدوده وزنی ۵۳ کیلودالتون دو باند پروتئینی وجود داشت که تراکم آن با گذشت زمان، در روزهای ششم و نهم افزوده شد (شکل ۱).

در تیمار آب شور نیز، دامنه‌ی باندهای پروتئینی قابل مشاهده از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در محدوده وزنی ۳۰ تا ۵۳ کیلودالتون سه باند وجود داشت که

به طوری که، این روند معنی‌دار نبود. در روز ششم نیز همین روند تکرار شد. روز نهم روند تغییرات کاملاً افزایشی بود، به طوری که در تیمار ۱۴ ppt این افزایش معنی‌دار بود ($p < 0/05$). کمترین میزان آلکالین فسفاتاز موکوس در روز سوم و شوری ۱۴ ppt برابر با میانگین $2 \pm 19/67$ و بیشترین مقدار آن در روز نهم در همین شوری با میانگین $14/78 \pm 49/62$ مشاهده گردید. در شوری ۰/۲ ppt اختلاف معنی‌داری طی روزهای نمونه‌برداری مشاهده نشد. در شوری ۷ ppt، روند تغییرات تا روز سوم افزایشی و تا روز نهم کاهش بود ولی این روند در هیچ یک از روزها معنی‌دار نبود. در شوری ۱۴ ppt، میزان این پارامتر تا روز سوم کاهش، سپس تا روز نهم روند افزایشی را طی کرد که در روز نهم این افزایش معنی‌دار بود ($p < 0/05$) (جدول ۶).

لیزوزیم موکوس

در روز سوم، تغییرات لیزوزیم موکوس، از تیمار ۰/۲ ppt به ۷ ppt افزایش، و در شوری ۱۴ ppt کاهش یافت که اختلاف معنی‌داری نداشت. در روز ششم، روند کاهشی داشت که در تیمارهای ۷ و ۱۴ ppt مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$).

در روز نهم نیز این روند کاهشی بود، به طوری که اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). حداقل میزان لیزوزیم موکوس مربوط به روز ششم و شوری ۱۴ ppt با میانگین $0/173 \pm 25/6$ و حداکثر میزان آن، در روز سوم و شوری ۷ ppt با میانگین $0/15 \pm 79/83$ مشاهده شد که اختلاف معنی‌دار نداشت. در تیمار شاهد روند تغییرات معنی‌دار نبود. در شوری ۷ ppt، تا روز سوم میزان لیزوزیم افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$). پس از آن تا روز ششم کاهش یافت به طوری که کاهش

کیلودالتون مشاهده شد که تراکم آن در آب لب‌شور بیشتر بود. همچنین در محدوده وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون باند پروتئینی پرتراکمی دیده شد که تراکم آن در تیمار لب‌شور و شور در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود (شکل ۲).

تأثیر شوری و زمان بر آنالیز الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی

در آب شیرین، دامنه‌ی وزنی مولکولی قابل مشاهده از ۹ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در محدوده‌ی وزنی ۹ کیلودالتون، یک، و محدوده‌ی وزنی ۲۲ تا ۳۰ کیلودالتون، سه باند پروتئینی مشاهده گردید. همچنین در محدوده وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون یک باند دیده شد. همگی باندها دارای تراکم نسبتاً کمی بودند (شکل ۳).

در آب لب شور نیز همان باند پروتئینی مشاهده شد. با این تفاوت که در محدوده‌ی وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون، باند پروتئینی قابل مشاهده فقط در روز سوم مشاهده گردید. در محدوده وزنی ۲۲ تا ۳۰ کیلودالتون نیز تراکم دو باند پروتئینی مشاهده شده با گذشت زمان کاهش یافت. ولی تراکم وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون در همه‌ی زمان‌ها یکسان دیده شد (شکل ۳).

در آب شور نیز همان محدوده‌ی وزنی مشاهده گردید. با این تفاوت که در محدوده‌ی وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون، باند پروتئینی در همه‌ی روزها مشاهده شد. در محدوده وزنی ۲۲ تا ۳۰ کیلودالتون نیز تراکم دو باند پروتئینی مشاهده شده با گذشت زمان کاهش یافت. ولی تراکم وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون در همه‌ی زمان‌ها یکسان دیده شد (شکل ۳).

تراکم آن در روز ششم از دو زمان دیگر بیشتر بود. در محدوده ۵۳ کیلودالتون، باند پروتئینی پرتراکم دیده شده در روز ششم، تراکم بیشتری را نشان داد (شکل ۱).

در روز سوم، محدوده‌ی باندهای پروتئینی، از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون مشاهده شد. در وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون در هر سه تیمار آب شیرین، لب‌شور و شور باند متراکمی مشاهده گردید. در دامنه‌ی وزن مولکولی ۳۰ تا ۴۱ کیلودالتون، در تیمار آب شور باند پروتئینی نسبتاً خفیفی دیده شد. در محدوده‌ی وزن مولکولی ۵۳ کیلودالتون در هر سه تیمار دو باند پروتئینی دیده شد که از آب شیرین به آب شور تراکم آن افزایش یافت (شکل ۲).

در روز ششم، دامنه‌ی باندهای پروتئینی قابل مشاهده از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون، در هر سه تیمار آب شیرین، لب‌شور و شور باند متراکمی مشاهده گردید. در دامنه‌ی وزن مولکولی ۳۰ تا ۴۱ کیلودالتون، در تیمار آب شور باند پروتئینی نسبتاً خفیفی دیده شد. در هر سه تیمار در محدوده وزنی ۴۱ تا ۵۳ کیلودالتون دو باند پروتئینی با تراکم نسبتاً یکسان در هر سه تیمار دیده شد. در وزن مولکولی ۵۳ کیلودالتون تراکم باند پروتئینی مشاهده شده با افزایش شوری، افزایش قابل توجهی یافت (شکل ۲).

در روز نهم، نیز دامنه‌ی باندهای پروتئینی قابل مشاهده از ۲۲ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در محدوده‌ی وزنی ۳۰ تا ۴۱ کیلودالتون، در تیمار آب لب‌شور و شور باند پروتئینی خفیفی دیده شد، به طوری که تراکم آن در آب لب‌شور بیشتر بود. در هر سه تیمار، دو باند پروتئینی خفیف در محدوده وزن مولکولی ۴۱ تا ۵۳

جدول ۳: مقایسه میانگین آلکالین فسفاتاز سرم در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

آلکالین فسفاتاز سرم (ul ⁻¹)	شوری ۰/۲ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۱۴ ppt
قبل از تنش	۵۴/۹۲ ۱۳±/۷۸ ^{abc}	۵۵/۸۷ ۱۹±/۳ ^{abc}	۴۵/۶۷ ۲±/۸۴ ^{bcd}
روز سوم	۵۴/۹۲ ۱۳±/۷۸ ^{abc}	۳۵/۲۲ ۷±/۶۵ ^d	۳۱/۶۳ ۲±/۳ ^d
روز ششم	۵۵/۸۷ ۱۹±/۳ ^{abc}	۷۱/۶۸ ۱۷±/۲۱ ^a	۳۸/۰۳ ۶±/۳۷ ^{cd}
روز نهم	۴۵/۶۷ ۲±/۸۴ ^{bcd}	۶۳/۸۲ ۴±/۰ ^{ab}	۶۲/۴۹ ۲±/۷۵ ^{ab}

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار می‌باشد ($\alpha = 0/05$).

جدول ۴: مقایسه میانگین لیزوزیم سرم در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

فعالیت لیزوزیم سرم (mg/ml)	شوری ۰/۲ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۱۴ ppt
قبل از تنش	۲/۶ ۰±/۱ ^d	۲/۹۶ ۰±/۹۸ ^d	۲/۷۳ ۰±/۷ ^d
روز سوم	۲/۶ ۰±/۱ ^d	۸/۲ ۱±/۰ ^c	۲۱/۰ ۱±/۰ ^a
روز ششم	۲/۹۶ ۰±/۹۸ ^d	۸/۸۶ ۰±/۶۵ ^c	۱۶/۳۶ ۳±/۲ ^b
روز نهم	۲/۷۳ ۰±/۷ ^d	۸/۸۶ ۰±/۸۶ ^c	۱۵/۷۶ ۱±/۰۵ ^b

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار می‌باشد ($\alpha = 0/05$).

جدول ۵: مقایسه میانگین پروتئین محلول موکوس در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

پروتئین محلول موکوس (g dl ⁻¹)	شوری ۰/۲ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۱۴ ppt
قبل از تنش	۰/۳۸ ۰±/۱۳ ^{bc}	۰/۴۷ ۰±/۱۴ ^{bc}	۰/۵۲ ۰±/۴۴ ^{bc}
روز سوم	۰/۳۸ ۰±/۱۳ ^{bc}	۰/۷۸ ۰±/۵۱ ^{abc}	۰/۸۷ ۰±/۲۲ ^{ab}
روز ششم	۰/۴۷ ۰±/۱۴ ^{bc}	۰/۳۶ ۰±/۱ ^c	۰/۶۸ ۰±/۱۴ ^{abc}
روز نهم	۰/۵۲ ۰±/۴۴ ^{bc}	۰/۸۶ ۰±/۱۳ ^{ab}	۱/۱۶ ۰±/۰۷ ^a

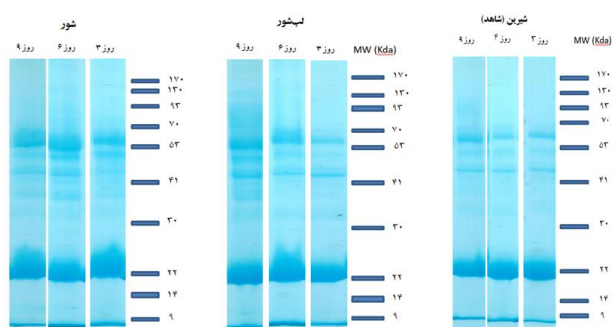
حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار می‌باشد ($\alpha = 0/05$).

در روز سوم، محدوده‌ی وزنی باندهای پروتئینی قابل مشاهده در همه‌ی تیمارهای از ۹ تا ۷۰ کیلودالتون بود. در محدوده وزنی ۹ کیلودالتون باند خفیفی در همه تیمارها مشاهده شد. همچنین در همه‌ی تیمارها در محدوده‌ی وزنی ۲۲ تا ۳۰ کیلودالتون سه باند پروتئینی کم‌تراکم وجود داشت. در محدوده‌ی وزنی ۵۳ تا ۷۰ کیلودالتون نیز در همه‌ی تیمارها باند پروتئینی خفیفی مشاهده گردید (شکل ۴). در روز ششم نیز همان باندهای پروتئینی در همان محدوده‌ی وزنی دیده شد. با این تفاوت که در تیمار شاهد تراکم باندها بیشتر از دو تیمار دیگر بود (شکل ۴). در روز نهم، محدوده‌ی باندها از ۹ تا ۷۰ کیلودالتون دیده شد. در محدوده وزنی ۹ کیلودالتون، باند پروتئینی دیده شده در آب شیرین نسبت به دو تیمار دیگری دارای تراکم بیشتری بود. همچنین در همه‌ی تیمارها در محدوده‌ی وزنی ۲۲ تا ۳۰ کیلودالتون سه باند پروتئینی کم تراکم وجود داشت. به‌طوری که، در تیمار آب شیرین تراکم بیشتری داشت. در محدوده وزنی ۵۳ کیلو دالتون نیز باند پروتئینی مشاهده شده در آب لب شور دیده نشد (شکل ۴).

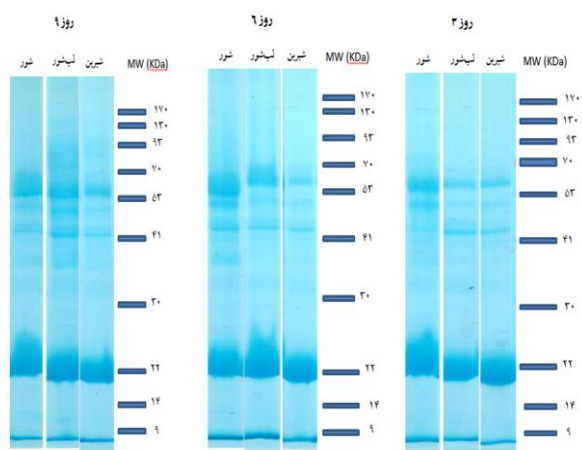
جدول ۲: مقایسه میانگین پروتئین تام سرم در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

پروتئین تام سرم (g dl ⁻¹)	شوری ۰/۲ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۱۴ ppt
قبل از تنش	۲/۶ ۰±/۵۵ ^{bc}	۲/۰۶ ۰±/۱۹ ^{cd}	۲/۲۲ ۰±/۵۱ ^{cd}
روز سوم	۲/۶ ۰±/۵۵ ^{bc}	۲/۷۹ ۰±/۱۵ ^b	۳/۵۲ ۰±/۲۶ ^a
روز ششم	۲/۰۶ ۰±/۱۹ ^{cd}	۲/۰۸ ۰±/۱۹ ^{cd}	۲/۰۵ ۰±/۲۹ ^{cd}
روز نهم	۲/۲۲ ۰±/۵۱ ^{cd}	۲/۱۱ ۰±/۱۲ ^{cd}	۱/۹ ۰±/۲۷ ^d

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار می‌باشد ($\alpha = 0/05$).



شکل ۱: الگوی پروتئینی سرم بچه ماهی کپور در مواجهه با غلظت‌های مختلف شوری (شیرین (۰/۲ ppt)، لب شور (۷ ppt) و شور (۱۴ ppt) در طی روزهای سوم، ششم و نهم پس از تنش



شکل ۲: الگوی پروتئینی سرم بچه ماهی کپور در مواجهه با غلظت‌های مختلف شوری (شیرین، لب شور و شور) طی روزهای سوم، ششم و نهم پس از تنش

جدول ۶: مقایسه میانگین آلکالین فسفاتاز موکوس در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

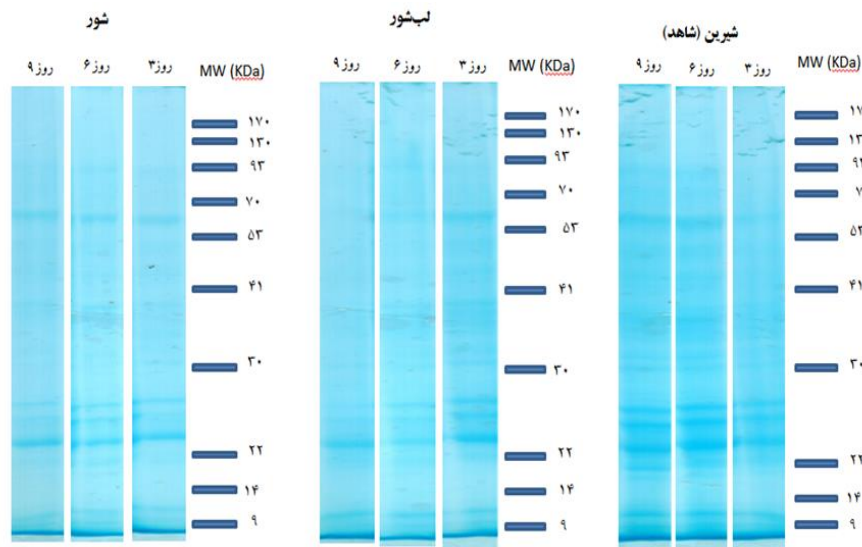
شوری ۱۴ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۰/۲ ppt	آلکالین فسفاتاز موکوس (ul ⁻¹)
۲۲/۵۷ ۲±/۹ ^b	۲۲/۵۱ ۸±/۷۳ ^b	۲۱/۸۷ ۶±/۴۴ ^b	قبل از تنش
۱۹/۶۷ ۲±/۳ ^b	۴۳/۸ ۸±/۵۳ ^b	۲۱/۸۷ ۶±/۴۴ ^b	روز سوم
۲۱/۴۴ ۵±/۰۶ ^b	۲۵/۱۱ ۹±/۳۸ ^b	۲۲/۵۱ ۸±/۷۳ ^b	روز ششم
۴۹/۶۲ ۱۴±/۷۸ ^a	۲۳/۵۱ ۱±/۴۲ ^b	۲۲/۵۷ ۲±/۹ ^b	روز نهم

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α=۰/۰۵).

جدول ۷: مقایسه میانگین لیزوزیم موکوس در اثر متقابل زمان × شوری. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

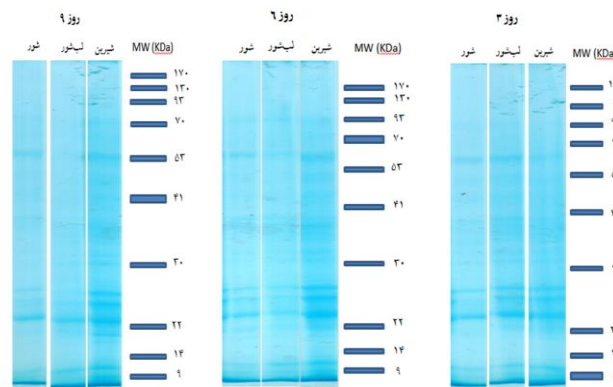
شوری ۱۴ ppt	شوری ۷ ppt	شوری ۰/۲ ppt	لیزوزیم موکوس (mg/ml)
۷۳/۵۳ ۵±/۷ ^a	۶۳/۹ ۴±/۷۱ ^a	۶۹/۴ ۴±/۰۱ ^{abc}	قبل از تنش
۲۹/۱۳ ۸±/۲۹ ^{ab}	۰±/۱۵ ^{bc}	۶۹/۴ ۴±/۰۱ ^{abc}	روز سوم
	۷۹/۸۳		
۲۵/۶ ۰±/۱۷۳ ^{bc}	۵۹/۶ ۸±/۳۱ ^c	۶۳/۹ ۴±/۷۱ ^a	روز ششم
۴۰/۲ ۳±/۶۵ ^d	۱۱±/۹۵ ^a	۷۳/۵۳ ۵±/۷ ^a	روز نهم
	۶۳/۲۶		

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (α=۰/۰۵).



شکل ۳: الگوی پروتئینی موکوس بچه ماهی کپور در مواجهه با غلظت‌های مختلف شوری (شیرین، لب‌شور و شور) طی روزهای سوم، ششم و

نهم پس از تنش



شکل ۴: الگوی پروتئینی موکوس بچه ماهی کپور در مواجهه با غلظت‌های مختلف شوری (شیرین، لب‌شور و شور) طی روزهای سوم، ششم و

نهم پس از تنش

نیستند. می‌توان نتیجه گرفت که تا سه روز اول مواجهه با تنش پاسخ ایمنی ایجاد شده و سطح ایمنوگلوبولین پروتئین تام سرم افزایش یافته است و پس از آن با ادامه یافتن تنش شوری ایمنی سرکوب شده و میزان آن کاهش و به حد نرمال قبل از تنش بازگشته است. اما در تناقض، قرار دادن ماهی سفید (*Rutilus fuisii*) به مدت ۱۱ روز تحت شوری‌های ۰/۹، ۶ و ۱۲ گرم در لیتر باعث اختلاف معنی‌دار پروتئین خون در بین تیمارها نشد (Imanpoor et al., 2011). اگرچه در مطالعات

بحث

افزایش پروتئین تام سرم با افزایش میزان شوری تا روز سوم پس از تنش، می‌تواند به علت افزایش نیاز ماهی به انرژی جهت تنظیم اسمزی و کاهش میل به غذا در شوری‌های بالا باشد (Martinez- Alvarez et al., 2002). پروتئین تام سرم که (به جز در ابتدای دوره) تحت تأثیر استرس شوری قرار نگرفتند. به‌عنوان شاخص نشان‌دهنده‌ی استرس شوری در این گونه مفید

تغییر در میزان فعالیت و ترشح آن‌ها می‌تواند متأثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Racicot et al., 1975). به طور کلی، اتفاق نظر محققین بر این است که فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته، ارتباط و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و ... دارد (Ross and Ross, 1999).

در شوری ۱۴ ppt میزان لیزوزیم سرم تا روز سوم افزایش معنی‌داری یافت. پس از آن تا روزهای ششم و نهم کاهش یافت. به طوری که این کاهش در مقایسه با سومین روز معنی‌دار بود. افزایش لیزوزیم در شوری‌های ۷ و ۱۴ ppt ناشی از پاسخ ایمنی بدن در مقابل عامل تنش‌زا (شوری) می‌باشد و کاهش آن تا روز نهم در شوری ۱۴ ppt به دلیل سرکوب ایمنی در استرس مزمن شوری متصور می‌شود. کاهش لیزوزیم می‌تواند ناشی از محدودیت شرایط فیزیکی و شیمیایی آب باشد. به این معنی که در شرایط فیزیکی و شیمیایی یکسان، در شوری‌های بالاتر اوضاع بحرانی‌تر بوده و ماهیان تنش بیشتری را تجربه خواهند نمود که بر سیستم ایمنی و میزان پاسخ‌های ایمنی آنها تأثیرگذار می‌باشد. Taylor و همکاران (۲۰۰۷)، تغییرات لیزوزیم را از آب شیرین به آب شور سنجیدند و با انتقال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آب شیرین به آب شور نشان دادند که فعالیت لیزوزیم سرم در آب شور افزایش می‌یابد که با مطالعه حاضر هم‌سو می‌باشد. افزایش آلکالین فسفاتاز موکوس نشان دهنده نیاز بیشتر ماهی به صرف انرژی جهت مقابله با شرایط استرس‌زا در این شوری (۱۴ ppt) است (Riche,

مختلف نتایج متفاوتی در مورد میزان پروتئین خون شامل کاهش (Sadhu et al., 2014)، افزایش (Montero et al., 1999) و یا ثبات (Caipang et al., 2009) در شرایط استرس، گزارش شده است. هرگونه تغییر در سطوح آلبومین، گلوبولین و پروتئین تامسرم می‌تواند به عنوان یک شاخص بالینی در پایش سلامت سیستم ایمنی، کبد و کلیه مورد استفاده قرار گیرد. عوامل متعددی بر میزان این پارامترها تأثیرگذار هستند و آن‌ها را دست‌خوش تغییرات می‌کنند، که از جمله‌ی این عوامل می‌توان تنش‌های محیطی را نام برد تصور می‌شود که افزایش میزان آلبومین، گلوبولین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان باشد. پروتئین خون از اساسی‌ترین اجزاء متابولیسم در آبزیان است و غلظت کل پروتئین موجود در سرمی خون به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگان‌های آبرزی به کار برده می‌شود و سنجش مقدار پروتئین خون می‌تواند آسیب‌های سلولی را پیش‌بینی کند (Riche, 2007).

در این تحقیق، بیشترین مقدار آلکالین فسفاتاز سرم در روز ششم در تیمار ۷ ppt با مقدار میانگین $17/21 \pm$ و کمترین مقدار آن در روز سوم در تیمار ۱۴ ppt با میانگین $31/63 \pm 2/3$ با تفاوت معنی‌داری از یکدیگر دیده شد. Palikova و همکاران (۲۰۱۰) تعیین کردند که افزایش مقادیر آلکالین فسفاتاز نشان دهنده ترشح ناقص صفرا بوده که ناشی از پایین بودن غذای خورده شده به دلیل بالا بالا بودن ناشی از افزایش سطح شوری باشد. اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز شاخص مناسبی جهت تعیین آسیب‌های کبدی است. آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و

2007). به طور کلی، ماهیان قرار گرفته در شوری پایین وضعیت فیزیولوژیک بهتری را نسبت به شوری زیاد نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌تواند منجر به افزایش پاسخ ایمنی موکوسی در برابر تنش‌هایی همچون افزایش سطح شوری شود. همچنین نشان داده شد که مقادیر عددی فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم، چندین (دو و سه) برابر آن در موکوس پوست است. آنزیم آلکالین فسفاتاز به دلیل دارا بودن فعالیت هیدرولیتیکی در موکوس به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی عمل می‌کند و مقدار آن در شرایطی مانند مراحل اولیه بهبود زخم‌ها، شرایط تنش‌زا به دلیل نقش حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد (Palashka et al., 2008). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شاخص بالقوه استرس است که در موکوس پوست سالمون آتلانتیک به اثبات رسیده است. افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند به علت پاسخ ایمنی موکوس پوست تحریک شده باشد (Ross et al., 2000). آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی عمل می‌کند و مقدار آن در شرایطی مانند مراحل اولیه بهبود زخم‌ها و شرایط تنش‌زا به دلیل نقش حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد (Palaksha et al., 2008).

Subramanian و همکاران (۲۰۰۷)، سطوح بالاتر لیزوزیم در مخاط پوست گونه‌های ماهیان آب دریا نسبت به گونه‌های آب شیرین را نشان دادند، که البته باید توجه داشت در این مطالعه برخلاف مطالعه حاضر از یک گونه برای تحقیق استفاده نشده است و صرفاً مقایسه گونه‌های دریایی و آب شیرین است. در گزارشی از سه گونه‌ی ماهی آزاد شامل: قزل آلا (Coho) *Oncorhynchus kisutch* و ماهی

آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و مقایسه داده‌های سطوح لیزوزیم در موکوس پوست در آب شیرین و شور (2 ± 30 ppt) نشان داده شد که سطح لیزوزیم موکوس در نمونه‌های آب شور در مقایسه با آب شیرین و در هر سه گونه پایین‌تر است (Fast et al., 2002). که هم‌سو با مطالعه حاضر می‌باشد. Nigam و همکاران (۲۰۱۲)، بیان کردند که تفاوت در سطح لیزوزیم موکوس پوست می‌تواند با تنوع گونه‌ای و زیستگاه ماهی مرتبط باشد. همچنین بیان شد که تفاوت در فعالیت لیزوزیم در موکوس پوست به عوامل مختلفی از جمله استرس، دستکاری، جنسیت، مرحله رسیدگی جنسی، رژیم غذایی، تنوع گونه‌ای و ژنتیک مرتبط است (Balfry and Iwama, 2004)، اما دلایل فیزیولوژیک این تغییر همچنان ناشناخته بوده و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. با توجه به مطالعات قبلی و مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که فعالیت لیزوزیم موکوس با لیزوزیم سرم رابطه عکس داشته و در صورت پایین آمدن مقدار آن، با فعالیت بیشتر، بدن را از ورود عفونت‌ها حفظ می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Taylor و همکاران (۲۰۰۷) روی قزل آلا صورت گرفت، نشان داد که با انتقال به آب دریا فعالیت لیزوزیم کاهش می‌یابد، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین نشان داد که مقادیر عددی فعالیت لیزوزیم در موکوس پوست چندین برابر (در برخی تیمارها تا ۳۰ برابر) آن در سرم خون است.

در این مطالعه با توجه به این که از فیزیولوژی ماهی در مواجهه با تغییرات شوری، شناخت بهتری کسب کردیم، توصیه می‌شود در مطالعات بعدی اثر استرس شوری بر سایر اندام‌های حیاتی ماهی کپور معمولی (از جمله: شاخص‌های خونی، کلیه، آبشش، کبد و

- stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. *Aquaculture*, 295(1-2), 110-115.
6. Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, Coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(3), 645-657.
 7. Imanpoor M., Enayat gholampoor T., Hosseini S.A., Shabanpoor B., 2011. Effect of different levels of salinity on growth indices, survival rate, food consumption and blood parameters in *Rutilus frisii kutum* (kamensky, 1901) fingerlings. *Iranian Journal of Biology*, 24(4), 539-549.
 8. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227(5259), 680.
 9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
 10. Martinez-Alvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., Garcia-Gallego, M. and Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *Journal of experimental biology*, 205(23) pp: 3699-3706.
 11. Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20(1), 53-60.
 12. Nigam, A.K., Kumari, U., Mittal, S., Mittal, A.K., 2012. Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish physiology and biochemistry*, 38(5), 1245-1256.
 13. Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R., Jung, T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus

گنדהا)، اثر سایر تنش‌های محیطی نظیر استرس دمایی، آمونیاک و ... بر شاخص‌های خونی، شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس و بررسی پارامترهای سرم خون جهت اندازه‌گیری هورمون‌های کورتیزول و پرولاکتین در تنظیم‌اسمزی بررسی شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. از همه‌ی بزرگوارانی که به نحوی در این پژوهش مساعدت نمودند، سپاس‌گزاری می‌نمایم.

منابع

۱. حافظ امینی، پ.، عریان، ش.، ۱۳۸۱. بررسی اثرات ناشی از استرس کلرور سدیم روی هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی کپور معمولی. *مجله علمی شیلات ایران*، ۱۱(۳)، ۲۱-۱۳.
۲. ذاکر، ف.، ایمان‌پور نمین، ج.، ستاری، م.، هادوی، م.، ۱۳۹۴. فعالیت لایزوزیم سرم خون و موکوس پوست ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) در اکوسیستم آب لب‌شور و آب شیرین. *توسعه آبی‌پروری*، ۱۰(۱) ۶۱-۵۳.
3. Austin, B., McIntosh, D., 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 11(3), 275-277.
4. Balfry, S.K., Iwama, G.K., 2004. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138(3), 207-211.
5. Caipang, C.M.A., Berg, I., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2009. Short-term crowding

- in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish physiology and biochemistry*, 40(4), 1105-1113.
22. 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), 256-263.
 23. Taylor, J.F., Needham, M.P., North, B.P., Morgan, A., Thompson, K., Migaud, H., 2007. The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 152(2-3), 314-325.
 24. Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G., 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 141, 401-429.
 - of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 24(4), 479-488.
 14. Palíková, M., Kopp, R., Mareš, J., Navrátil, S., Kubiček, Z., Chmelař, L., Bandouchová, H., Pikula, J., 2010. Selected haematological and biochemical indices of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in the environment with cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria Brno*, 79(9), 63-71.
 15. Peyghan, S., Salamat, N., 2012. Study of changes in the structure skin texture of *Carassius auratus* in Ahvaz city. *Histobiology Veterinary Journal*, 1(1), 1-4. (in Persian).
 16. Racicot, J.G., Gaudet, M. Leray, C., 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl₄ toxicity and a case of *Aeromonas* infection. *Journal of fish Biology*, 7(6), 825-835.
 17. Riche, M., 2007. Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture*, 264(1-4), 279-284.
 18. Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. *Fish physiology and biochemistry*, 40(5), 1601-1607.
 19. Ross L.G., , Ross B., 1999. Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK. 22 pp: 57.
 20. Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., , Johnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of aquatic organisms*, 41(1), 43-51.
 21. Sadhu, N., Sharma, S.K., Joseph, S., Dube, P., Philipose, K.K., 2014. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions