Archive of SID

تأثیر پلیمر طبیعی کیتوزان بر ایمونوگلبولین تام، هموگلوبین و مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)

علی اکبر طافی[1*]، سعید مشکینی[2]، امیر توکمه‌چی[3]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۲. دانشیار، گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۳. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.

دریافت: ۱۳ مهر ماه ۹۴ **پذیرش:** ۱ اسفند ماه ۹۴

چکیده

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مهم‌ترین گونه ماهی سردآبی پرورشی در ایران است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی بر تحریک ایمونوگلبولین تام سرم، غلظت هموگلوبین خون و میزان مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر آلودگی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) است. بدین منظور ۹۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۰/۱±۲۵ گرم) پس از گذراندن دو هفته دوره سازش با شرایط محیط آزمایش به طور تصادفی در چهار گروه (شامل ۳ گروه تیمار و یک گروه شاهد) و سه تکرار تقسیم شدند. ماهیان با مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان که پس از حل شدن در اسید استیک یک درصد روی غذای کنسانتره (FFT2) اسپری گردید، به مدت هشت هفته تغذیه شدند. تمام تیمارها تا سه هفته دیگر با جیره کنترل (بدون کیتوزان) تغذیه شدند. در آغاز پرورش و نیز در هفته‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۱ از تمام تیمارها خون‌گیری به عمل آمد و مقدار ایمونوگلبولین تام سرم و غلظت هموگلوبین خون اندازه‌گیری شد. در پایان هفته هشتم به همه تیمارها مقدار 10^7 *CFU/ml* باکتری بیماری‌زای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به صورت داخل صفاقی تزریق شد؛ نتایج نشان داد که افزودن ۰/۲۵ درصد کیتوزان به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۵۶ روز قادر است به طور معنی‌داری ($p<0/05$) موجب افزایش ایمونوگلبولین تام سرم و غلظت هموگلوبین خون نسبت به گروه شاهد شود و مقاومت این گونه را در برابر آلودگی باکتری با *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، کیتوزان، ایمونوگلبولین تام، غلظت هموگلوبین، *آئروموناس هیدروفیلا*.

مقدمه

ماهیان در محیط اسارت از شرایط طبیعی بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی مطلوب زندگی بهره‌مند نیستند و محکوم به ادامه زندگی در شرایط موجودند که ممکن است نامساعد باشد و موجب کاهش مقاومت بدن آن‌ها در برابر بیماری‌های گوناگون شود (۲). امروزه افزایش سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای پژوهشگران است. علاوه بر این بروز و همه‌گیری بیماری‌ها در کنار پیشرفت و توسعه صنعت آبزی‌پروری، از لحاظ اقتصادی این صنعت را تحت تأثیر قرار داده، به نحوی که کنترل برخی از بیماری‌ها به امری دشوار تبدیل شده‌است (۳۱).

از جمله روش‌های مبارزه با آلودگی‌های باکتریایی که

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: aliakbartafi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

تاکنون در آبزی‌پروری به کار گرفته شده‌اند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است که متاسفانه به دلیل پدیده مقاومت باکتری‌ها در برابر داروهای استفاده شده، درمان ناموفق را به یکی از مشکلات مهم پیش روی پرورش‌دهندگان ماهی تبدیل کرده‌است (۵).

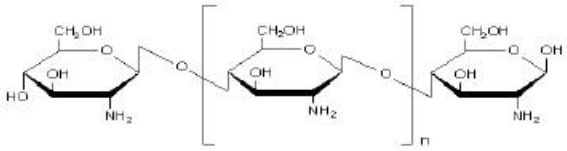
یکی از مؤثرترین روش‌های مناسب برای کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری، افزایش مقاومت طبیعی سیستم ایمنی آبزیان به منظور ایجاد آمادگی در رویارویی با عوامل بیماری‌زا ست که با استفاده از محرک‌های ایمنی امکان پذیر خواهد بود. محرک‌های ایمنی با بالا بردن مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌ها، در مدیریت سلامت ماهی در آبزی‌پروری نقش مهمی دارند. محرک‌های ایمنی که تاکنون اثر آن‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است شامل مواد شیمیایی، ترکیبات باکتریایی، پلی ساکاریدها، عصاره‌های گیاهی و جانوری، فاکتورهای تغذیه‌ای (ویتأمین‌ها و اسیدهای آمینه)، سیتوکین‌ها (Cytokines) هستند (۱۳ و ۲۸) که موجب تسهیل عمل سلول‌های بیگانه‌خوار و افزایش فعالیت‌های ضدباکتریایی آن‌ها می‌شود (۱۵)؛ همچنین؛ محرک‌های ایمنی موجب تحریک سلول‌های طبیعی کشنده (Natural killer cells) و پاسخ‌های آنتی‌بادی در ماهی می‌شوند (۲۸)؛ این مواد به علاوه موجب افزایش تولید اینترفرون‌ها (Interferons)، اینترلوکین‌ها (Interleukins) و پروتئین‌های کمپلمان (Complement proteins) می‌شوند که خود موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌های B و T می‌گردند (۲۵). محرک‌های ایمنی قادرند مقاومت تقریباً بلندمدتی را در ماهی ایجاد کنند و موجب فعال کردن ماکروفاژها (۱۵ و ۱۶) که در ماهیان نقش مهمی در ایمنی سلولی دارند، گردند (۲۶)؛ بنابراین نقش محرک‌های ایمنی در مدیریت پیش‌گیری بیماری‌های آبزیان انکارناپذیر است. با این وجود که محرک‌های ایمنی مورد استفاده در آبزی‌پروری طیف وسیعی را شامل می‌شوند، امروزه علاقه به انواع طبیعی آن‌ها به دلیل سادگی استفاده و نداشتن عوارض جانبی در حال افزایش است (۲۳).

یکی از گروه‌های مهم محرک ایمنی که در آبزیان کاربرد دارد پلی‌ساکاریدها هستند. کیتین یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از نظر فراوانی پس از سلولز دومین پلیمر طبیعی موجود در دنیاست. کیتین به طور تجاری از پوسته سخت‌پوستان خصوصاً خرچنگ‌ها و میگوها تهیه می‌شود (۳۰). یکی از محصولات مهم و کاربردی که از کیتین تهیه می‌شود کیتوزان (شکل ۱) است که با استیل‌زدایی کیتین تهیه می‌شود. پژوهشگران کیتوزان را ماده‌ای غیرسمی، بی‌خطر و تجزیه‌پذیر در محیط‌زیست معرفی کرده‌اند. کیتوزان در آبزی‌پروری به روش‌های مختلفی از جمله ترکیب با غذا، تزریق و غوطه‌وری به عنوان یک محرک ایمنی برای پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی به کار رفته‌است (۸).

مزایای استفاده از کیتوزان در آبزی‌پروری به ثبت رسیده و پژوهشگران مختلف بارها آن را گزارش کرده‌اند (۸). Dautremepiuits و همکاران در سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴، Wang و Chen در سال ۲۰۰۵، Gopalakannan و Arul در سال ۲۰۰۶ و Cha و همکاران در سال ۲۰۰۸ خاصیت محرک ایمنی کیتوزان را در گونه‌های مختلف آبزیان مورد بررسی و مطالعه قرار داده‌اند و در نتایج پژوهش‌های خود تأثیرات مطلوب این ماده را بر تحریک سیستم ایمنی آبزیان گزارش کرده‌اند؛ بنابراین با توجه به نقش مهم محرک ایمنی کیتوزان در تحریک پاسخ‌های ایمنی، افزایش مقاومت ماهیان در برابر عوامل استرس‌زا و آسان و عملی بودن کاربرد این ماده در مزارع پرورش آبزیان، تصمیم بر آن شد تا در پژوهش حاضر تأثیر مقادیر مختلف کیتوزان به صورت خوراکی روی برخی شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مورد بررسی قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- ساختار ملکولی کیتوزان و واحدهای گلوکز آمین تشکیل دهنده آن

مواد و روش کار

تعداد ۹۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۱±۲۵ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی خریداری و با تانکر مخصوص حمل بچه ماهی (مجهز به کپسول اکسیژن) به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه منتقل شد. پس از ضدعفونی ماهیان با محلول نمک طعام ۵ درصد و گذراندن ۱۰ روز دوره قرنطینه، ماهیان به صورت کاملاً تصادفی در چهار گروه (شامل ۳ گروه تیمار و یک گروه شاهد) و هر گروه با سه تکرار در ۱۲ حوضچه ۳۰۰ لیتری (این حوضچه‌ها قبلاً با کلر *ppm* ۲۰۰ کاملاً ضدعفونی شدند)، هر کدام حاوی ۱۵۰ لیتر آب تقسیم شدند. منبع تأمین آب پرورش ماهیان از یک حلقه چاه عمیق و میزان دبی ورودی به کل حوضچه‌ها ۷۰ لیتر در دقیقه (حدود ۶ لیتر در دقیقه برای هر حوضچه) بود. در طول این مطالعه (هشت هفته) آب حوضچه‌های پرورشی جاری و میانگین دما، شوری، اکسیژن محلول و pH آن‌ها به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد.

کیتوزان مورد استفاده در این پژوهش با نام تجاری **Aminolabs** از شرکت **Award** آمریکا تهیه شد (جدول ۱). غذای کنسانتره مورد استفاده برای تغذیه ماهیان در ابتدای دوره از نوع **FFT-2** و با گذشت زمان و رشد ماهی‌ها از **GFT-1** استفاده گردید. برای آماده‌سازی جیره غذایی تیمارها، ابتدا با توجه به میانگین وزنی بچه ماهیان و دمای آب، مقدار غذای روزانه هر تیمار از روی جدول استاندارد غذادهی (۱۷) محاسبه و سپس کیتوزان لازم با مقادیر ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا با ترازوی دیجیتال و با دقت یک صدم گرم وزن شد. پس از حل کیتوزان در اسید استیک (۱ درصد) محلول حاصل به طور جداگانه به ترتیب روی غذای تیمارهای دو، سه و چهار اسپری شد و غذاها در دمای اتاق خشک شدند. تیمارهای دو، سه و چهار به مدت هشت هفته با جیره‌های تهیه شده تغذیه شدند و سپس همه‌ی تیمارها به مدت سه هفته با جیره کنترل (فاقد کیتوزان) تغذیه شدند. ماهیان تیمار یک به عنوان شاهد بودند و در تمام طول دوره پژوهش فقط با جیره کنترل تغذیه شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های کیتوزان مورد استفاده

ویژگی	مقدار
حالت و رنگ ظاهری	پودر سفید مایل به زرد
رطوبت (درصد)	۳۴/۹
خاکستر (درصد)	۰/۷۵
درجه استیل‌زدایی (درصد)	۹۱/۰۱
چگالی (گرم بر میلی‌لیتر)	۰/۶۱۴

برای تهیه نمونه‌های خون، هر دو هفته یک بار و همچنین در پایان دوره از هر تیمار تعداد ۱۵ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب شدند و پس از بی‌هوشی با محلول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک (۳)، با قطع ساقه دمی از آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد. سپس خون به دست آمده به دو قسمت تقسیم شد و قسمت اول برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین با ۱۰۰ میکرولیتر ماده ضدانعقاد سیترات سدیم ۳/۶ درصد مخلوط گردید؛ قسمت دوم نمونه خون برای تهیه سرم و اندازه‌گیری ایمونوگلبولین تام استفاده شد. سرم تهیه شده تا زمان اندازه‌گیری ایمونوگلبولین تام در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۲).

برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین خون از کیت ویژه آن با کد (CAT NO.10 – 532) و بر اساس روش سیانومت هموگلوبین با یک محلول استاندارد تجاری به نام

www.SID.ir

Archive of SID

محلول Drabkins استفاده شد. در این روش، هموگلوبین خون با معرف Drabkins که حاوی پتاسیم‌فری‌سیانید است واکنش می‌دهد و اکثر مشتقات آن تبدیل به سیانومت هموگلوبین می‌شوند. جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر با مقدار هموگلوبین موجود در نمونه خون ارتباط مستقیم دارد (۱).

برای اندازه‌گیری ایمونوگلبولین تام سرم از روشی که Siwicki و همکاران در سال ۱۹۹۴ ارائه دادند استفاده شد (۳۲). اساس کار بر روش رنگ‌سنجی Bradford (۶) استوار بود. در این شیوه میزان جذب نوری محلول Coomassie Brilliant Blue G-250 (به عنوان ماده رنگ‌پذیر) هنگام اتصال با پروتئین‌های سرم، در طول موج ۵۹۵ نانومتر برای محاسبه میزان پروتئین‌ها به کار می‌رود. در این روش از غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان محلول استاندارد استفاده گردید.

برای ایجاد آلودگی تجربی ماهیان با باکتری *آئرومونواس هیدروفیلا* (BCG/LMG 3740) ابتدا باکتری مذکور با تست‌های بیوشیمیایی تائید شده و سپس در شرایط استریل و زیر هود لامینار برای تولید انبوه در محیط آبگوشت (BHI) (مرک، آلمان) کشت داده‌شد. برای این منظور از یک ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت (BHI) استفاده شد. پس از کشت باکتری، ارلن حاوی محیط کشت در شرایط هوازی درون انکوباتور شیکردار (ساخت شرکت N-Biotech, INC کره جنوبی)، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور *rpm* ۷۵ به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد باکتری محتویات ارلن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور *rpm* ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد و دو بار به کمک بافر PBS استریل شست و شو شد. در مرحله آخر سوسپانسیونی از باکتری در بافر استریل PBS تهیه و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند تراکم باکتری 10^7 *CFU/ml* تنظیم شد (۷).

در انتهای هفته هشتم (پایان دوره تغذیه با غذای کیتوزان‌دار) از هر تیمار تعداد ۱۲ قطعه ماهی به طور تصادفی برای تزریق انتخاب شد. ابتدا ماهیان با مقدار *ppm* ۱۵۰ پودر گُل میخک (۳) بیهوش شدند و در هر قطعه ماهی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^7 *CFU/ml* باکتری با سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی تزریق شد؛ سپس ماهیان هر تیمار در حوضچه‌های جداگانه به مدت یک هفته نگهداری شدند و رفتار و تلفات آن‌ها روزانه در دو نوبت صبح (ساعت ۶) و عصر (ساعت ۱۸) ثبت شد. آب حوضچه‌ها در طی مواجه باکتریایی جاری نبود و از سنگ هوا و پمپ برای هوادهی استفاده می‌شد و روزانه ۵۰ درصد آب حوضچه‌ها تعویض می‌گردید (۲۲).

داده‌های حاصل از این پژوهش با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 20، آنالیز آماری One-Way ANOVA، آزمون Tokay تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، استفاده از میزان ۰/۲۵ درصد کیتوزان در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش مقدار ایمونوگلبولین تام سرم می‌شود که تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) این مقدار نسبت به گروه شاهد و دیگر تیمارها از هفته چهارم تا پایان دوره پرورش واضح است.

استفاده از کیتوزان در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش غلظت هموگلوبین خون می‌شود و این افزایش براساس نتایج جدول ۳ در مقدار ۰/۲۵ درصد کیتوزان نسبت به گروه شاهد و دیگر تیمارها معنی‌دار ($p<0/05$) است. افزایش معنی‌دار غلظت هموگلوبین خون در تیمار دوم (۰/۲۵ درصد کیتوزان) از هفته ششم تا پایان دوره پژوهش در جدول ۲ درج شده

www.SID.ir

Archive of SID

است.

جدول ۲- مقدار ایمونوگلبولین تام سرم (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای تیمارهای مختلف در هفته‌های نمونه‌برداری

تیمارها	هفته‌های نمونه‌برداری					
	روز اول	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم	هفته یازدهم
تیمار ۱ (شاهد)	۲/۹۴±۰/۰۸^{a}	۳/۰۶±۰/۰۴^{a}	۳/۱۹±۰/۰۳^{b}	۳/۲۴±۰/۳۱^{c}	۳/۲۵±۰/۰۵^{c}	۳/۵۰±۰/۳۵^{b}
تیمار ۲ (٪ ۰/۲۵ کیتوزان)	۲/۹۳±۰/۰۷^{a}	۳/۴۰±۰/۳۶^{a}	۴/۰۰±۰/۴۳^{a}	۴/۳۴±۰/۰۹^{a}	۴/۴۳±۰/۰۶^{a}	۴/۳۷±۰/۱۱^{a}
تیمار ۲ (٪ ۰/۵ کیتوزان)	۲/۹۰±۰/۲۴^{a}	۳/۲۰±۰/۶۲^{a}	۳/۶۰±۰/۰۷^{ab}	۳/۹۰±۰/۱۵^{b}	۳/۹۵±۰/۴۸^{ab}	۳/۷۲±۰/۲۶^{b}
تیمار ۲ (٪ ۱ کیتوزان)	۲/۹۴±۰/۲۳^{a}	۳/۱۵±۰/۴^{a}	۳/۳۰±۰/۱۷^{b}	۳/۵۰±۰/۱۸^{c}	۰/۵۳±۰/۰۲^{bc}	۳/۵۱±۰/۰۵^{b}

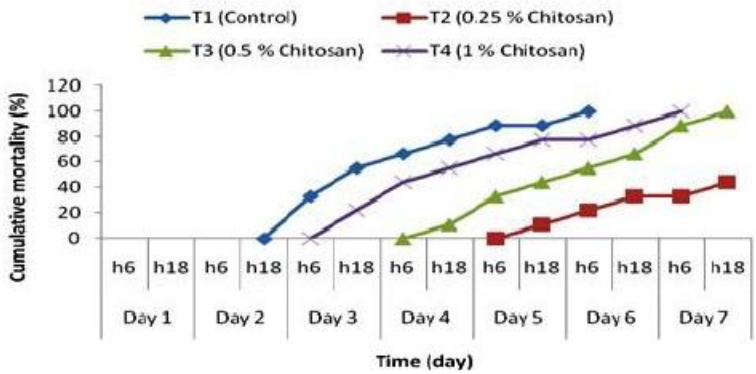
اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) هستند.

جدول ۳- غلظت هموگلوبین خون (گرم در دسی‌لیتر) برای تیمارهای مختلف در هفته‌های نمونه‌برداری

تیمارها	هفته‌های نمونه‌برداری					
	روز اول	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم	هفته یازدهم
تیمار ۱ (شاهد)	۷/۱۰±۰/۴۹^{a}	۷/۳۰±۱/۰۱^{a}	۷/۵۰±۱/۱۲^{a}	۷/۸۷±۱/۳۲^{b}	۸/۱۶±۰/۱۲^{c}	۸/۸۶±۱/۶۹^{b}
تیمار ۲ (٪ ۰/۲۵ کیتوزان)	۷/۲۸±۱/۱۶^{a}	۷/۷۸±۱/۶۶^{a}	۹/۱۳±۰/۸۰^{a}	۱۰/۱۳±۰/۲۴^{a}	۱۲/۰۶±۰/۱۸^{a}	۱۱/۴۱±۰/۴۵^{a}
تیمار ۲ (٪ ۰/۵ کیتوزان)	۷/۱۴±۰/۵۶^{a}	۷/۳۵±۱/۵۹^{a}	۸/۱۷±۱/۰۷^{a}	۸/۸۲±۰/۲۹^{ab}	۹/۶۲±۰/۶۸^{b}	۹/۳۰±۰/۱۱^{b}
تیمار ۲ (٪ ۱ کیتوزان)	۷/۱۴±۰/۵۲^{a}	۷/۵۱±۱/۶۰^{a}	۸/۸۵±۰/۴۵^{a}	۸/۵۸±۰/۲۹^{b}	۹/۲۶±۰/۲۵^{b}	۹/۲۱±۰/۲۳^{a}

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) هستند.

نمودار ۱ درصد تلفات ثبت شده همه تیمارها در طول یک هفته پس از آلودگی تجربی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را نشان می‌دهد که بر اساس آن تیمار دوم (۰/۲۵ درصد کیتوزان) با کمترین تلفات مقاوم‌ترین تیمار شناخته شد.



نمودار ۱- درصد تلفات قزل‌آلای رنگین‌کمان طی یک هفته پس از تزریق درون صفاقی با *آئروموناس هیدروفیلا*

بحث

از جمله محرک‌های ایمنی مهم مورد استفاده در آبزی‌پروری کیتوزان است که از گروه پلی‌ساکاریدهاست و پژوهشگران زیادی اثر این ماده را روی سیستم ایمنی گونه‌های مختلف آبزیان به شیوه‌های گوناگون گزارش کرده‌اند (۲۹). کیتوزان در آبزی‌پروری به عنوان محرک

www.SID.ir

Archive of SID

ایمنی برای افزایش مقاومت آزاد ماهیان در برابر بیماری‌های باکتریایی (۴ و ۳۲) و همچنین به عنوان یک ماده ترکیبی در جیره آن‌ها استفاده شده‌است (۲۰).

طبق گزارش‌هایی که پژوهشگران مختلف منتشر کرده‌اند کیتوزان برای حیوانات ماده‌ای طبیعی و غیرسمی است به گونه‌ای که Kono و همکاران در سال ۱۹۸۷ سمی نبودن ۱۰ درصد کیتوزان را به صورت خوراکی در سه گونه از ماهیان دریایی گزارش کرده‌اند (۲۰) و همچنین Siwicki و همکاران در سال ۱۹۹۴ استفاده از غلظت ۵ درصد کیتوزان را در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان برای این گونه غیرسمی گزارش کرده‌اند (۳۲).

با توجه به تفاوت‌های فیزیولوژیکی در گونه‌های مختلف آبزیان، مواد محرک رشد در گونه‌های متفاوت با سطوح مختلف بر شاخص‌های ایمنی تأثیرگذار هستند (۱۴). با توجه به این که به نظر برخی پژوهشگران کیتوزان تأثیر خود را بر سیستم ایمنی، هضم و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش ماهیان در سطوح پایین بهتر نشان می‌دهد (۱۴)، در این پژوهش تصمیم گرفته شد تأثیر سطوح کم کیتوزان (نسبت به سطوح استفاده شده کیتوزان از سوی پژوهشگران قبلی تاکنون) به صورت خوراکی بررسی شود؛ بنابراین علاوه بر مقدار ۱۰ گرم، مقدار ۵ و ۲/۵ گرم نیز انتخاب شدند و تأثیر آن‌ها بر میزان ایمونوگلبولین تام سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد و همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در این پژوهش هم کیتوزان با کمترین مقدار به کار رفته؛ یعنی مقدار ۰/۲۵ درصد (تیمار دوم) تقریباً در تمام مدت یازده هفته‌ای دوره پژوهش تأثیر بیشتری نسبت به گروه شاهد بر افزایش میزان ایمونوگلبولین تام سرم قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته است. به گزارش Kitao و همکاران در سال ۱۹۸۷ و Chen و Ainsworth در سال ۱۹۹۲ مبنی بر نقش کیتوزان در افزایش تولید ایمونوگلبولین توسط گلبول‌های سفید خون و همچنین گزارش Dautremepuits و همکاران در سال ۲۰۰۳ مبنی بر تأثیر حمام هشت روزه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با مقادیر ۷۵ *mg/l* و ۱۵۰ *mg/l* کیتوزان بر افزایش میزان ایمونوگلوبولین تام کبد و کلیه، نتیجه پژوهش حاضر را تأیید می‌کند (۱۱).

سیستم فیزیولوژی ماهیان پس از بروز استرس سعی بر سازگار شدن و مقابله با استرس وارد شده دارد و برای این کار نیازمند اکسیژن و صرف انرژی بیشتر است. با توجه به این که مسیر اصلی انتقال اکسیژن در ماهیان از طریق هموگلوبین خون است (۲۴)، بنابراین اگر محرک‌های ایمنی توانایی تحریک و افزایش میزان هموگلوبین خون ماهیان را داشته باشند، این امکان وجود دارد که با استفاده از آن‌ها اکسیژن مورد نیاز ماهیان برای رویارویی احتمالی با عوامل استرس‌زا را تأمین کرد. به عبارت دیگر در چنین شرایطی می‌توان سیستم فیزیولوژی ماهیان را در شرایط آماده‌تری برای رویارویی با عوامل استرس‌زا قرار داد (۳۳)؛ بنابراین در پژوهش حاضر برای پی بردن به وجود تأثیر کیتوزان در قزل‌آلای رنگین‌کمان، اقدام به اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین خون گردید که نتایج بیانگر این بود که کیتوزان با همان مقداری که موجب افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) ایمونوگلبولین تام سرم گردید (۰/۲۵ درصد)، هموگلوبین خون را هم به طور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده‌است (جداول ۲ و ۳). نتایج پژوهش Cha و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی تأثیر دان‌های غذایی پوشش داده‌شده با کیتوزان به مدت ۱۲ هفته روی ماهی فلاندر (*Parallichtcys olivaseus*) هم بیانگر تأثیر فزاینده کیتوزان بر هموگلوبین خون این گونه بوده‌است (۹).

محرک‌های ایمنی به طور کلی از طریق افزایش مکانیسم‌های دفاعی غیراختصاصی در ماهیان، موجب افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به طیف گسترده‌ای از آلودگی‌های پاتوژنی می‌گردند و مقاومت ماهیان را در برابر این عوامل افزایش می‌دهند. این مواد با اتصال به گیرنده‌های خاص موجود در سطح سلول‌های بیگانه‌خوار و لنفوسیت‌ها موجب تولید بیش‌تر آنزیم‌هایی می‌شوند و این

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم‌ها خود موجب از بین رفتن عوامل بیماری‌زا می‌شوند (۲۵).

مدت زمان و مقدار استفاده از محرک‌های ایمنی در تأثیر آن‌ها بر سیستم ایمنی آبزیان نقش بسیار مهمی دارد، به گونه‌ای که بنابر گزارش **Matsuo** و **Miyazano** در سال ۱۹۹۳ استفاده از پپتیدوگلوکان به مدت ۲۸ روز به صورت خوراکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب حمایت این گونه در برابر آلودگی به *Vibrio anguillarum* شد (۲۱)؛ همچنین بنابر گزارش **Kawakami** و همکاران در سال ۱۹۹۸ تزریق کیتین به ماهی دُم‌زرد تنها در مدت زمان ۴۵ روز بر مقاومت این ماهی در برابر آلودگی به *Pasturella piscicida* مؤثر است و این اثر تا ۴۵ روز پس از تزریق این ماده به ماهی در بدن آن باقی می‌ماند (۱۸). **Anderson** و **Siwicki** در سال ۱۹۹۴ گزارش کردند که با یکبار تزریق مقدار ۱۰۰ میکروگرم کیتوزان در ۱۰۰ گرم وزن بدن قزل‌آلای رنگین‌کمان، این گونه در برابر حمام ۱۴ روزه با باکتری بیماری‌زای *Aeromonas salmonicida* مقاومت کرده‌است (۴). **Gopalakannan** و **Arul** در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند کیتوزان پس از ۴۵ روز موجب بیش‌ترین رشد در ماهیان شده و با افزایش فعالیت لیزوزیم سرم موجب بازمانی ۸۰ درصدی آنان در برابر آلودگی با باکتری *Aeromonas hydrophila* گردید (۱۴). **Robertsen** و همکاران در سال ۱۹۹۴ گزارش داده‌اند که فعالیت ماکروفاژها در اثر استفاده از گلوکان با مقدار ۰/۱-۱$\mu g/ml$ بیشترین میزان بوده در حالیکه مقدار ۱۰$\mu g/ml$ گلوکان نه تنها هیچ‌گونه تأثیری بر فعالیت ماکروفاژها نداشته است بلکه در مقدار ۵۰$\mu g/ml$ گلوکان، تاثیر معکوس در فعالیت ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها مشاهده شده است (۲۶).

در پژوهش حاضر هم تیمارهای چهارگانه با مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان به مدت ۵۶ روز (هشت هفته) تغذیه شدند و برای بررسی مدت زمان ماندگاری اثر این محرک ایمنی بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سه هفته پس از قطع کیتوزان از جیره غذایی، از همه‌ی تیمارها نمونه‌برداری شد و فاکتورهای یاد شده مجدداً مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

همان‌گونه که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود در پایان هفته هشتم (پایان دوره تغذیه با غذای حاوی کیتوزان) تیمار دوم (تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان) به ترتیب بیشترین مقدار ایمونولگوبولین تام و هموگلوبین را دارد و با تیمار شاهد تفاوتش معنی‌دار ($p<0/05$) است و هرچند در پایان دوره پژوهش (هفته یازدهم) مقدار این فاکتورها در تیمارهای دوم، سوم و چهارم کمی کاهش را نشان می‌دهد، اما باز هم تیمار دوم همچنان بهترین شرایط را نسبت به گروه شاهد دارد و نتایج حاصل از تلفات تیمارها پس از آلودگی تجربی با باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* (نمودار ۱) نیز تایید کننده همین موضوع است. به عبارت دیگر می‌توان گفت که تأثیر محرک کیتوزان بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده پس از حذف آن از جیره به مدت سه هفته (پایان هفته هشتم تا پایان هفته یازدهم) همچنان باقی مانده و موجب مقاومت بیشتر تیمار دوم در برابر رویارویی با باکتری *آئرومونا*س هیدروفیلا شده است (نمودار ۱). لازم به یادآوری است که پی بردن به زمان حذف کامل اثر کیتوزان (به صورت خوراکی) بر سیستم ایمنی قزل‌آلا، نیاز به بررسی و پژوهش بلند مدت‌تر دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود برای افزایش سطح پاسخ‌های ایمنی و اثر بازماندگی بیشتر قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر بیماری‌های باکتریایی به‌ویژه باکتری *آئرومونا*س هیدروفیلا در مزارع آبزی‌پروری، از میزان ۰/۲۵ درصد کیتوزان به صورت همراه با جیره غذایی و به مدت ۵۶ روز (هشت هفته) استفاده گردد.

منابع

۱- براون، باربارا؛ اصول هماتولوژی و روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشگاهی؛ (ترجمه طالب آذرم و فاطمه نادعلی)؛ انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۱۳۷۰؛ ۱۹۰-۲۳۹.

۲- مخیر، بابا؛ بیماری‌های ماهیان پرورشی؛ چاپ ششم؛ انتشارات دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۹؛ ۵۹۵ صفحه.

۳- مهرابی، یدالله؛ مطالعه مقدماتی اثر بیهوش کنندگی پودر گل درخت میخک بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان؛ مجله پژوهش و سازندگی؛ ۱۳۷۸؛ ۴۰، ۴۱، ۴۲: ۱۶۰-۱۶۲.

4- Anderson, D.P. and Siwicki, A.K; Duration of protection against *Aeromonas salmonisida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. The progressive Fish-Culturist; 1994; 56: 258-261.

5- Aoki, T. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: Shariff, M; Subasighe, R.P. and Arthur, J.R. (Eds.); Diseases in Asian Aquaculture; Vol. 1. Fish Health Section; Asian Fisheries Society; Manila; Philippines; 1992; pp: 519-529.

6- Bradford, M; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Journal of Clinical Biochemistry; 1976; 72: 248-254.

7- Brunt, J. and Austine, B; Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Disease; 2005; 28: 693-701.

8- Bullock, G; Blazer, V. and Tsukuda, S; Toxicity of acidified Chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture; 1999; 185: 273-280.

9- Cha, S.H; Lee, J.S; Song, C.B. and Lee, K.J; Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture; 2008; 278: 110-118.

10- Chen, D. and Ainsworth, A.J; Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. Journal of Fish Disease; 1992; 15: 295-304.

11- Dautremepuits, C; Betoulle, S; Paris-Palacios, S. and Vernet, G. Immunology-Related perturbations induced by copper and chitosan in carp (*Cyprinus carpio*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology; 2003; 47: 370-378.

12- Dautremepuits, C; Betoulle, S; Paris-Palacios, S. and Vernet, G. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitized carp (Cyprinus carpio) by *Ptychobpthriom* sp. (Cestod).

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Toxicology; 2004; 68: 325-338.

13- Dugenci, K.S; Arda, N. and Canadan, A; Some medicinal plants as immunostimulants for fish. Journal of Ethnopharmacology; 2003; 88: 99-106.

14- Gopalakannan, A. and Arul, V; Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisol and immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophyla* infection in pond. Aquaculture; 2006; 255: 179-187.

15- Haq, A; Abdullatif, M; Lobo, P; Khabar. K; Sheth, K. and Alsedairy, S; Nigella sativa effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leucocyte phagocytic activity. Journal of Immunopharmacology; 1995; 30: 147-155.

16- Haq, A; Lobo, P; Al-Tufail, M; Rama, N. and AL-Sedair, Y.S; Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. International Journal of Immunopharmacology; 1999; 21: 283-295.

17- Hardy, R.W; Nutrient requairment and feeding of fish for aquaculture; CABI Publishing; Walling ford; Oxon; United Kingdom; 2002; pp: 184-202.

18- Kawakami, H; Shinohara, N. and Sakai, M; The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. Fish Pathology; 1998; 33: 287-292.

19- Kitao, T; Yoshida, T; Anderson, D.P; Dixon, O.W. and Blanch, A; Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. Journal of Fish Biology; 1987; 31: 87-91.

20- Kono, M; Matsui, T. and Shimizu, C; Effect of chitin, Chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. Nippon Suisun Gakkaishi; 1987; 53: 125-129.

21- Matsuo, K. and Miyazano, I; The influence of long term administration of peptidoglucan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nipon Suisan Gakkaishi; 1993; 59: 1377-1379.

22- Mesalhy, S; Mohamed, F.M. and John, G; Effect of probiotics on the survival, growth and challeng

www.SID.ir

Archive of SID

infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research; 2008; 39: 674-656.

23- Panigrahi, A; Kiron, V. and Satoh, S; Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry; 2010; 61: 21-29.

24- Perry, S.F. and Tufts, B.L; Fish respiration; Academic press; 1998; pp: 356.

25- Raa, R; Rorstad, G; Engstad, R. and Robertsen, B; The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Shariff, M; Subasighe, R.P. and Arthur, J.R; (Eds.); Disease in Asian Aquaculture; Vol. 1. Fish Health Section; Asian Fisheries Society; Manila; Philippines; 1992; pp: 39-50.

26- Roberts, R. Fish Pathology; 2th.Ed. Bailiere Tindall London; 1989; pp: 467.

27- Robertsen, B; Ehgstad, R.E. and Jorgensen, J.B; β-glucan as immunostimulants in fish. In: Stolen, J.S. and Fletcher, T.C; (Eds.); Modulators of Fish Immune Responses. Vol. 1. SOS Publication; Fair Haven; 1994; pp: 83-99.

28- Sakai, M; Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture; 1999; 172: 63-92.

29- Sakai, M. Kamiya, H; Ishii, S; Atsuta, S. and Kobayashi, M; The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Shariff, M; Subasighe, R.P. and Arthur, J.R. (Eds.); Diseases in Asian Aquaculture. Vol. 1. Fish Health Section; Asian Fisheries Society; Manila; Philippines; 1992; pp: 413-417.

30- Sandford, P.A; Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjak-braek, G., Anthonsen, T. and Sanford, P. (Eds.); Chitin and Chitosan: Sources, Properties, and Aplications. Elsevier London; 1989; pp: 51-69.

31- Shalaby, A.M; Khattab, Y.A. and Abdel-Rahman, A.M; Effects of (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases; 2006; 12: 172-201.

www.SID.ir

Archive of SID

32- Siwicki, A.K; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L; Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis, Veterinary Immunology and Immunopathology; 1994; 41: 125-139.

33- Vahedi, G. and Ghodratizadeh, S; Effect of Chitin Supplemented Diet on Innate Immune Response of Rainbow Trout. World Journal of Fish and Marine Sciences; 2011; 3(6): 509-513.

34- Wang, S.H. and Chen, J.C; The protective effects of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fish and Shellfish Immunology; 2005; 19: 191-204.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of natural polymer chitosan on total immunoglobulin, hemoglobin concentration and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*

Tafi, A.A[1*]; Meshkini, S[2]; Tokmechi, A.[3]

1. PhD Candidate of Aquaculture, Natural Resources Faculty, Urmia University, Urmia- Iran.
2. Associate Professor, Department of Food and Hygiene, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia- Iran.
3. Associate Professor, Department of Pathobiology and Quality Control of Aquatics, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia- Iran.

Recieved: 5 October 2015 ***Accepted:*** 20 February 2016

Summary

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is the main farmed cold water fish in Iran. This study was conducted to determine the effect of Chitosan as an immune stimulator on total immunoglobulin and blood hemoglobin concentration of rainbow trout and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. 900 rainbow trout (25± 0.1 *g* mean weight) after acclimated to laboratory conditions for two weeks divided into four groups in three replicates randomly. The fish were fed with different concentrations of Chitosan (0, 0.25, 0.5 and 1 percent of feed). Chitosan was solved in acetic acid (1%) and sprayed on a commercial feed pellet (FFT2) and fed the fish for eight weeks. All experimental groups were fed with control diet (without Chitosan) for three weeks later. Sampling was conducted at 0, 2, 4, 6, 8 and 11 weeks of the trial and total immunoglobulin and blood hemoglobin concentration were measured. All trial were injected (IP) with a pathogenic strain of *Aeromonas hydrophila* at a level of 10^7 *CFU/ml* at the end of 8 week. Results showed that adding Chitosan at 0.25 percentage of feed could significantly ($P<0.05$) increase total immunoglobulin as well as blood hemoglobin concentration in comparison to the control group, and improves rainbow trout resistance against bacterial infection.

Keywords: **Rainbow trout, Chitosan, Total immunoglobulin, Hemoglobin concentration,** *Aeromonas hydrophila*.

* Corresponding Author E-mail: aliakbartafi@gmail.com

www.SID.ir