# مطالعه تأثیر کیتوزان بر برخی از پاسخهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و افزایش مقاومت آن به دنبال رویاروئی تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا*

**علی اکبر طافی[۱]، سعید مشکینی[۲،*] و امیر توکمه‌چی[۲]**

[۱] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

## چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی بر سیستم ایمنی و میزان مقاومت ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا* می باشد. برای این منظور ۹۰۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزنی ۰/۱۰±۲۵/۶۲ گرم) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس ماهیان به مدت ۱۰ روز با شرایط آزمایشگاه سازگار شده و به چهار گروه تقسیم شدند. به ترتیب گروهها با مقادیر ۰ (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان (Chitosan) همراه غذای تجاری (GFT-1) به مدت هشت هفته تغذیه شدند. در طول مطالعه هر دو هفته یکبار از تمام تیمارها خونگیری شده و فعالیت لیزوزیم (Lysozyme activity) و مقدار گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase) سرم خون اندازه گیری شد. در پایان دوره تحقیق همه تیمارها با مقدار $10^7$ CFU/ml باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به صورت درون صفاقی (Intera peritoneal) تزریق شده و ماهیان به مدت یک هفته روزی دو بار از نظر علائم بالینی و تلفات مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد افزودن ۰/۲۵ درصد کیتوزان به جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان به مدت ۵۶ روز می‌تواند به طور معنی داری ($p<0.05$) فعالیت لیزوزیم و مقدار گلوتاتیون پراکسیداز سرم را نسبت به گروه شاهد افزایش دهد. همچنین نتایج ثابت کرد که میزان مقاومت این تیمار در رویارویی با باکتری بیماریزای *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش می‌یابد. بر اساس یافته‌های حاصل مانند میزان لیزوزیم و گلوتاتیون پراکسیداز سرم، می‌توان نتیجه گیری کرد که کیتوزان می‌تواند ایمنی ماهی قزل آلا را در مقابل باکتری مورد آزمایش افزایش دهد.

**واژه های کلیدی:** قزل آلای رنگین کمان، کیتوزان، فعالیت لیزوزیم، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، *آئروموناس هیدروفیلا*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۴۴۰۲۹۵-۰۴۴۱، پست الکترونیکی: s.meshkiniy@urmia.ac.ir

## مقدمه

یکی از عمده‌ترین مسائلی که پرورش دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان ماندگاری و بقای ماهیان به خصوص در مراحل اولیه زندگی می‌باشد. بر این اساس تقویت سیستم ایمنی بدن ماهیان به ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم ترین رویکرد محققان می‌باشد. علاوه بر این بروز و همه گیری بیماریها در کنار پیشرفت و توسعه صنعت آبزی پروری، از لحاظ اقتصادی این صنعت را تحت تأثیر قرار داده، به نحوی که امروزه کنترل برخی از بیماریها با مشکل مواجه شده است (۳۰).

ماهیان در محیط اسارت از شرایط طبیعی بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی مطلوب زندگی بهره مند نبوده و محکوم به

ادامه زندگی در شرایط موجود می باشند که ممکن است نامساعد بوده و باعث کاهش مقاومت بدن آنها در برابر بیماریهای گوناگون شود (۶).

طی دو دهه گذشته مصرف داروهای ضد میکروبی برای درمان عفونتهای مختلف ماهیان به خصوص بیماریهای باکتریایی افزایش پیدا کرده است، این مسئله می‌تواند موجب ایجاد مقاومت دارویی در باکتریها، تجمع و باقی ماندن این مواد در بدن ماهیان پرورشی، ایجاد خطرات بهداشتی برای مصرف کنندگان و نیز آلودگی محیط زیست گردد (۹).

امروزه استفاده از محرکهای ایمنی یکی از روشهایی است که به منظور پیشگیری و کنترل بیماریها در آبزی پروری به کار می‌رود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد محرکهایی مانند گلوکان (Glucan)، لاکتوفرین (Lactoferin)، کیتین (Chitin)، کیتوزان و لوامیزول (Levamisole) باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی و میگو می‌شوند. فاکتورهای تغذیه‌ای نظیر ویتامین ب، ث و برخی هورمونها مانند هورمون رشد (Growth hormone) و پرولاکتین (Prolactine) نیز به عنوان محرک ایمنی گزارش شده‌اند. این محرکها سبب تسهیل عمل بیگانه خواری سلولهای فاگوسیت کننده و افزایش فعالیت ضد باکتریایی آنها می شوند (۱۹).

کیتوزان یک نوع پلی ساکارید با خاصیت تحریک رشد و تقویت ایمنی در آبزیان بوده که از نظر ساختار شیمیایی پلیمری از گلوکز آمین (Glucosamin) می‌باشد و از استیل زدایی (Deacetylation) کیتین به دست می‌آید. کیتوزان نسبت به کیتین حلالیت بیشتری در آب و سایر حلالهای قطبی دارد. این ماده دارای بار الکتریکی مثبت بوده که همین امر سبب ایجاد پیوند با غشاهای حاوی بار منفی می‌شود (۲۱ و ۲۷).

امروزه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان یکی از عمده‌ترین گونه‌های ماهیان پرورشی در اکثر مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی، در بیشتر نقاط جهان شناخته شده است (۴). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر مقادیر مختلف کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان و افزایش مقاومت این گونه به دنبال آلودگی تجربی با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* می‌باشد.

## مواد و روشها

**الف: تهیه و ذخیره سازی بچه ماهیان:** در این تحقیق تعداد ۹۰۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی۰/۱۰±۲۵/۶۲ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهرستان ارومیه خریداری و با تانکر مخصوص حمل بچه ماهی مجهز به کپسول اکسیژن به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه منتقل شد. بلافاصله بچه ماهیان به دو حوضچه ۱۰۰۰ لیتری از جنس پلی اتیلن (قبلاً با کلر ppm ۲۰۰ کاملا ضد عفونی شدند)، هر کدام حاوی ۹۰۰ لیتر آب انتقال داده شدند. قبل از شروع آزمایش اصلی بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز قرنطینه و با شرایط جدید سازش داده شدند، همچنین در طول این مدت ماهیان با استفاده از محلول نمک طعام ۵ درصد ضد عفونی شدند. پس از اتمام دوره قرنطینه ماهیان به صورت کاملاً تصادفی در قالب چهار تیمار و هر کدام با سه تکرار در ۱۲ حوضچه ۳۰۰ لیتری (قبلاً با کلر ppm ۲۰۰ کاملاً ضد عفونی شدند)، هر کدام حاوی ۱۵۰ لیتر آب و ۷۵ قطعه ماهی تقسیم شدند. در طول این مطالعه (هشت هفته) آب حوضچه‌های پرورشی با دبی پنج لیتر در دقیقه جاری بوده و میانگین دما، شوری، اکسیژن محلول و pH آنها به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد.

**ب: تهیه کیتوزان و آماده سازی جیره‌های غذایی:** کیتوزان مورد استفاده در این تحقیق با نام تجاری آمینولبز (Aminolabs) از شرکت آوارد (Award) آمریکا تهیه شد (جدول ۱). غذای کنسانتره مورد استفاده برای تغذیه ماهیان

در ابتدای دوره از نوع FFT-2 (ساخت شرکت فرآدانه-ایران) و با گذشت زمان و رشد ماهیها از GFT-1 استفاده گردید (جدول ۲). برای آماده سازی جیره غذایی تیمارها، ابتدا با توجه به میانگین وزنی بچه ماهیان و دمای آب، مقدار غذای روزانه هر تیمار از روی جدول استاندارد غذادهی (۱۶) محاسبه و سپس کیتوزان لازم با مقادیر ۲/۵ (تیمار ۲ با ۰/۲۵ درصد کیتوزان)، ۵ (تیمار ۳ با ۰/۵ درصد کیتوزان) و ۱۰ (تیمار ۴ با ۱ درصد کیتوزان) گرم در هر کیلوگرم غذا با ترازوی دیجیتال و با دقت یک صدم گرم وزن شد. سپس با غلظت ۲ درصد در اسید استیک ۱ درصد حل شده و با اسید استیک حجمها یکسان سازی و محلول حاصل به طور جداگانه به ترتیب روی غذای تیمارهای دو، سه و چهار اسپری گردید. سعی شد کیتوزان به طور یکنواخت با کل غذا مخلوط گردد، سپس اجازه داده شد غذا در دمای اتاق خشک گردد. ماهیان تیمار یک به عنوان شاهد بوده و در تمام طول دوره تحقیق فقط با جیره کنترل حاوی اسید استیک یک درصد تغذیه شدند. لازم به ذکر است که ماهیان تیمارها به مدت هشت هفته از کیتوزان تغذیه شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های کیتوزان مورد استفاده (شرکت آوارد – آمریکا)

| ویژگی | مقدار |
|---|---|
| حالت و رنگ ظاهری | پودر سفید مایل به زرد |
| رطوبت (درصد) | ۳۴/۹ |
| خاکستر (درصد) | ۰/۷۵ |
| درجه استیل زدایی (درصد) | ۹۱/۰۱ |
| چگالی (گرم بر میلی لیتر) | ۰/۶۱۴ |

جدول ۲- درصد ترکیبات اصلی غذاهای تجاری مورد استفاده برای تغذیه تیمارها (شرکت فرآدانه – ایران)

| ترکیبات | FFT-2 | GFT-1 |
|---|---|---|
| پروتئین | ۴۰ | ۳۸ |
| چربی | ۱۴ | ۱۴ |
| خاکستر | ۱۰ | ۱۰ |
| فیبر | ۳/۵ | ۴ |
| فسفر | ۱/۲ | ۱/۱ |
| رطوبت | ۱۱ | ۱۱ |

**پ: خونگیری، تهیه سرم و اندازه گیری پارامترهای ایمنی:** در طول این مطالعه هر دو هفته یکبار از همه تیمارها تعداد ۱۵ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با محلول ۱۵۰ میلی گرم در لیتر پودر گل میخک (۵ و ۷)، با قطع ساقه دمی از آنها خونگیری شد. پس از جداسازی سرم نمونه‌ها تا زمان اندازه گیری پارامترهای ایمنی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۳۱).

**سنجش گلوتاتیون پراکسیداز سرم:** برای اندازه گیری این آنزیم از کیت رندوکس رندکس (انگلستان) استفاده شد.

**اندازه گیری فعالیت لیزوزیم سرم:** برای اندازه گیری لیزوزیم سرم از روش (Cha *et al.*, 2008) استفاده گردید (۱۲). اساس این روش بر پایه لیز باکتری گرم مثبت *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* (Sigma, M 3770, St. Louis, USA) توسط لیزوزیم استوار است. به طور خلاصه، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* با غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر در بافر سیترات سدیم ۰/۰۲ مولار (pH = ۵/۵)، به ۱۵ میکرولیتر نمونه سرم در چاهکهای یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با الایزا خوان (اوارنس، آمریکا) قرائت گردید. طبق تعریف یک واحد فعالیت لیزوزیم برابر با میزان سرمی است که باعث کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه گردد.

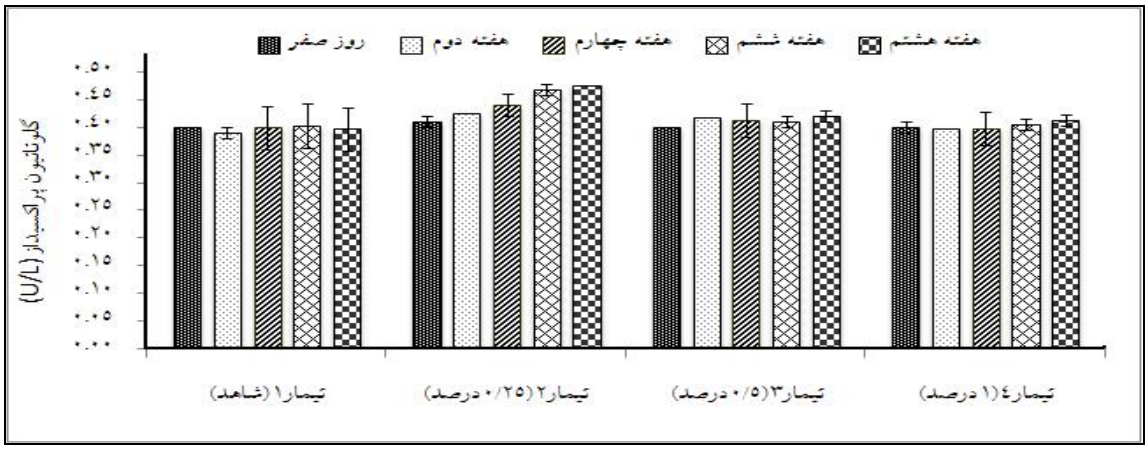
**ت: کشت باکتری و آماده سازی آن جهت تزریق درون صفاقی:** در این مطالعه از باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (BCG/LMG 3740) استفاده شد. ابتدا باکتری مذکور توسط تستهای بیوشیمیایی تأیید شده، سپس در شرایط استریل و زیر هود لامینار جهت تولید انبوه در محیط آبگوشت (BHI) (مرک، آلمان) کشت داده شد. برای این منظور از یک ارلن ۲۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت (BHI) استفاده شد. پس از کشت

باکتری، ارلن حاوی محیط کشت در شرایط هوازی درون انکوباتور شیکر دار (ساخت شرکت N-Biotek, INC کره جنوبی)، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با دور ۷۵ rpm به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از رشد باکتری محتویات ارلن در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ و دو بار به کمک بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله آخر سوسپانسیونی از باکتری در بافر استریل PBS تهیه و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند تراکم باکتری $۱۰^{۷}$ CFU/ml تنظیم شد (۱۱).

جدول ۳- میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در دقیقه (U) برای تیمارهای مختلف در هر هفته نمونه برداری

| تیمارها | هفته های نمونه برداری | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | روز صفر | هفته دوم | هفته چهارم | هفته ششم | هفته هشتم |
| تیمار۱(شاهد) | ۶۱۵/۶۷±۵$^{a}$ | ۶۱۱/۰۰±۳۶/۶۶$^{b}$ | ۶۱۶/۳۳±۲/۶۴$^{b}$ | ۶۰۸/۶۷±۸۰/۷۵$^{b}$ | ۶۰۷/۳۳±۳/۰۵$^{c}$ |
| تیمار۲ | ۶۱۷/۶۶±۶/۴۳$^{a}$ | ۶۸۳/۳۳±۱۷/۱۰$^{a}$ | ۷۱۱/۰۰±۴۹/۳۲$^{a}$ | ۷۲۴/۰۰±۴۸/۸۷$^{a}$ | ۷۵۸/۰۰±۴۲/۰۰$^{a}$ |
| تیمار۳ | ۶۱۳/۳۳±۱۱/۵۵$^{a}$ | ۶۳۱/۰۰±۲۷/۱۰$^{ab}$ | ۶۴۲/۶۷±۲۰/۰۳$^{b}$ | ۶۶۱/۰۰±۱۱/۰۰$^{ab}$ | ۶۷۸/۶۷±۲۵/۰۳$^{b}$ |
| تیمار۴ | ۶۱۸/۰۰±۲۸/۶۱$^{a}$ | ۶۲۴/۳۳±۳۵/۰۲$^{b}$ | ۶۲۵/۶۷±۴۶/۵۲$^{b}$ | ۶۴۱/۶۷±۵۱/۶۰$^{ab}$ | ۶۶۰/۳۳±۳۲/۰۰$^{b}$ |

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار ($p<0.05$) هستند.




نمودار ۱- روند تغییرات آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/L) برای هر تیمار در هفته های نمونه برداری

پس از پایان هفته هشتم از هر تیمار (هم تیمار شاهد و هم تیمارهای کیتوزان) تعداد ۹ قطعه ماهی به طور تصادفی (از هر تکرار سه قطعه) انتخاب شد. برای تزریق ابتدا ماهیان با مقدار ۱۵۰ قسمت در میلیون پودر گل میخک (۵) بیهوش شده و در هر قطعه ماهی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریای حاوی $۱۰^{۷}$ CFU/ml باکتری به وسیله سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی تزریق انجام شد (هر قطعه ماهی میزان $۱۰^{۶}$ CFU دریافت کرد). سپس ماهیهای هر تیمار در حوضچه های جداگانه به مدت یک هفته نگهداری و رفتار و تلفات آنها روزانه در دو نوبت صبح (ساعت ۶) و عصر (ساعت ۱۸) ثبت شد. لازم به ذکر است که قبلاً در مطالعه جداگانه ای (منتشر نشده) LD50 باکتری آئروموناس هیدروفیلا در قزل آلای رنگین کمان بر اساس روش Reed and Muench بررسی و محاسبه گردید که برابر با $۱۰^{۷}$ CFU/ml بود (۲۶).

آب حوضچه ها در طی مواجه باکتریایی جاری نبوده و از سنگ هوا و پمپ برای هوادهی استفاده شد و روزانه ۵۰ درصد آب حوضچه ها تعویض گردید (۲۴).

**ث- تجزیه و تحلیل آماری:** در این تحقیق همه تیمارهای تغذیه ای دارای سه تکرار بوده و داده های حاصل با نرم افزار آماری SPSS، برنامه One-Way ANOVA، آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جداول و نمودارها به ترتیب با نرم افزار Word و EXCEL ترسیم گردیدند.

## نتایج

میانگین دما، شوری، اکسیژن محلول و pH آب حوضچه های حاوی ماهیها به ترتیب ۱۴/۲ درجه سانتی گراد، ۰/۳ گرم در لیتر، ۹/۵ میلی گرم در لیتر و ۷/۵ بوده است.

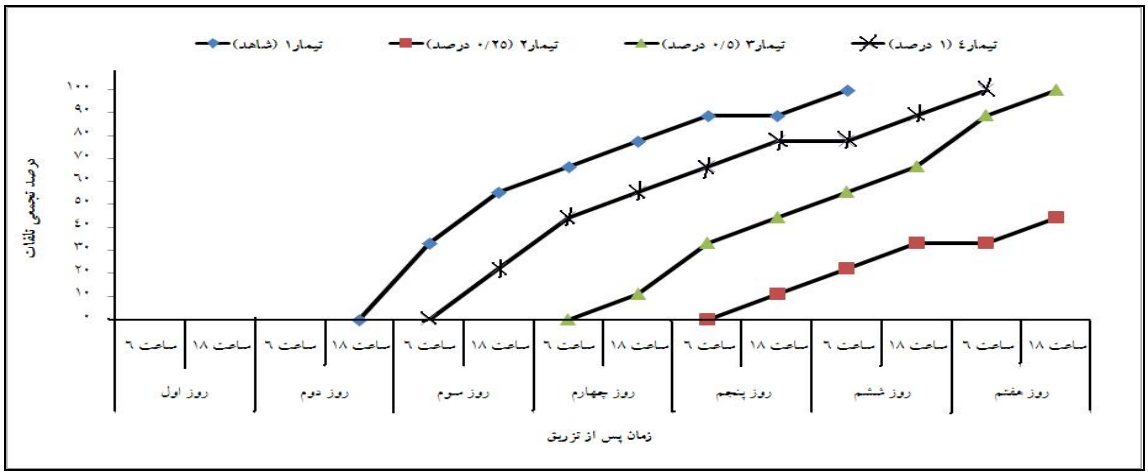
جدول ۳ بیانگر میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در تیمارهای مختلف می باشد که طی هفته های خونگیری در تمام تیمارها اندازه گیری شده و مورد مقایسه قرار گرفته است.

نمودار ۱ بیانگر میزان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهای مختلف می باشد که طی هفته های نمونه گیری از خون ماهیان تمام گروههای تیماری اندازه گیری شده است و برای هر تیمار در هفته های مختلف مقایسه شده است.

در بررسی تلفات ماهیان تیمارهای مورد تزریق با *آئروموناس هیدروفیلا*، تمام تیمارها به جز تیمار دوم (تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان) قبل از پایان یک هفته به تلفات صد درصدی رسیدند. پس از تیمار دوم، به ترتیب تیمارهای سوم (تغذیه شده با ۰/۵ درصد کیتوزان) و چهارم (تغذیه شده با ۱ درصد کیتوزان) نسبت به گروه شاهد در برابر آلودگی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مقاومت بیشتری از خود نشان دادند (نمودار ۲).

## بحث و نتیجه گیری

استفاده از محرکهای ایمنی یکی از روشهایی است که با هدف تقویت سیستم ایمنی آبزیان خصوصاً مکانیسمهای دفاع غیر اختصاصی برای پیشگیری و کنترل بیماریها در آبزی پروری به کار می رود. گزارشهای متعددی در مورد تأثیر محرکهای ایمنی مختلف بر سیستم ایمنی ماهیان و میگوها ارائه شده است (۱۹).




نمودار ۲- تلفات تیمارهای تغذیه شده با مقادیر مختلف کیتوزان طی یک هفته پس از تزریق درون صفاقی با *آئروموناس هیدروفیلا*

محرکهای ایمنی پاسخهای سیستم ایمنی را افزایش داده و باعث افزایش حمایت در برابر عوامل بیماری زا می شوند (۲۸). تا کنون محققین زیادی از محرکهای ایمنی مختلف برای بالا بردن مقاومت آبزیان در برابر استرسهای مختلف استفاده کرده اند. Kajita و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که تزریق لوامیزول با مقادیر ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در قزل آلای رنگین کمان باعث افزایش فعالیت سلولهای بیگانه خوار می شود (۱۸). Tewary و

همکاران (۲۰۰۸) تأثیر مثبت تزریق مقدار ۱۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ویتامین C را بر مقاومت گونه کپور هندی روهو *(Labeo rohita)* در برابر *Aeromonas hydrophila* گزارش کرده اند (۳۲). همچنین اکبری و همکاران (۱۳۸۷) افزایش مقاومت لاروهای قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب و ویتامین C را در مقابل تنشهای محیطی دما و کمبود اکسیژن گزارش نموده اند (۱). به عبارتی استفاده از غذای زنده به تنهایی یا همراه با غذای کنسانتره و به ویژه در صورتی که از مواد محرک ایمنی غنی شده باشند، در افزایش قدرت دفاعی بدن لارو ماهیان نقش به سزایی دارد (۲).

یکی از محرکهای مهم که تا کنون برای ارتقای سیستم ایمنی آبزیان مورد استفاده قرار گرفته است، کیتوزان می باشد که پلیمری از گلوکز آمین می باشد. پژوهشگران زیادی تأثیر این ماده را بر افزایش پاسخهای ایمنی گونه های مختلفی از آبزیان مورد بررسی قرار داده اند. Gopalakannanو Arul (۲۰۰۶) بازماندگی ۸۰ درصدی گونه کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* در برابر *Aeromonas hydrophila* را در اثر مصرف ۱ درصد کیتوزان به صورت مخلوط با غذای آن گزارش نموده‌اند و دلیل آن را تقویت پاسخهای ایمنی غیر اختصاصی این ماهی توسط کیتوزان بیان کرده‌اند (۱۵). تأثیر کیتوزان در افزایش مقاومت آبزیان دیگری همچون میگوی پا سفید (*Litopenaeus vannamei*) در برابر *Vibrio alginoliticus* (۳۳)، قزل آلای جویباری *(Salvelinus fontinalis )* در مقابل *Aeromonas salmonisida* (۱۰) و قزل آلای رنگین کمان در برابر *Aeromonas salmonisida* (۳۱) نیز گزارش شده است. در این تحقیق هم تأثیر کیتوزان بر برخی شاخصهای سیستم ایمنی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم و مقدار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز سرم خون تیمارهای چهارگانه قزل آلای رنگین کمان که به ترتیب با مقادیر ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان تغذیه شده بودند هر دو هفته یکبار تا هفته هشتم (۵۶ روز) اندازه گیری گردید (جدول ۳ و نمودار ۱).

از آنجایی که طبق گزارشات مختلف محرکهای ایمنی باعث افزایش فعالیت سیستم کمپلمان خون (۱۴)، افزایش فعالیت لیزوزیم سرم (۱۴ و ۱۷) و تولید آنتی بادی بیشتر توسط سلولهای سفید خون (۱۳ و ۲۲) می‌شوند، کیتوزان هم مانند سایر مواد محرک ایمنی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر پاسخهای ایمنی در آبزیان دارد به گونه ای که Wang و Chen (۲۰۰۵) نشان دادند که تزریق µg/g ۴ و ۲µg/g کیتوزان در میگوی وانامی *(Litopenaeus vannamei)* پس از یک روز باعث افزایش در میزان فعالیت فاگوسیتی سلولهای بیگانه خوار خون در برابر باکتری *Vibrio alginoliticus* می گردد (۳۳). همچنین بنا بر نظر Shahidi و همکاران (۱۹۹۹) و No و همکاران (۲۰۰۲) شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کیتوزان در صورت مصرف خوراکی باعث افزایش فعالیت آنتی باکتریال (سرم) در ماهیان شده و از ابتلا به عفونتهای باکتریایی جلوگیری می-کند (۲۵ و ۲۹). در این تحقیق هم مصرف خوراکی کیتوزان خصوصاً با مقدار ۰/۲۵ درصد (تیمار ۲) به دلیل افزایش فعالیت لیزوزیم و افزایش مقدار گلوتاتیون پراکسیداز پلاسما باعث ارتقای سطح ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید (جدول ۳ و نمودار ۱).

یوسفیان و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی اثر زئولیت بر فاکتورهای ایمنی و آنزیمی ماهی کپور دریای مازندران گزارش نمودند که کاربرد زئولیت ضمن بهبود کیفیت آب محیط پرورشی، بر خصوصیات فیزیولوژیکی و ایمونولوژیکی ماهیان تحت تیمار با زئولیت در مقایسه با گروه شاهد تأثیر مثبتی داشته و ارتقا داده است، هر چند این تفاوتها معنی دار نبوده است (۸).

همچنین فقانی و همکاران در تحقیقی در سال ۱۳۸۸، اثر ارگوسان و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس را بر پارامترهای

خونی ماهیان قزل آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند، استفاده از واکسن به تنهایی و در ترکیب با ارگوسان به مدت چهار ماه نشان داد که در خیلی از پارامتر های خونی تفاوتی بین ماهیان شاهد و گروههای تیماری وجود نداشته و تنها اثر استفاده از واکسن و ارگوسان افزایش معنی دار لنفوسیتها و تعداد کل گلبولهای سفید خون بوده است که نشان از افزایش مقاومت ماهیان می باشد (۵).

حسینی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۱ تأثیر ماده ال – کارنیتین را بر روی مراحل اولیه رشد و ترکیبات بدن قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند علی رغم استفاده از مقادیر ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم ال کارنیتین در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۸ روز، تفاوتی بین گروه شاهد و گروههای تیماری در رشد ماهیان و ترکیبات بدنی از جمله میزان چربی و پروتئین مشاهده نگردید (۳).

نتایج بررسی تلفات ماهیان قزل آلا پس از مواجهه با آلودگی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا در پایان هفته هشتم این تحقیق نیز بیانگر افزایش مقاومت ماهیان تیمار دوم در برابر آلودگی با این باکتری بوده (نمودار ۲) که خود دلیلی بر تحریک سیستم ایمنی قزل آلای رنگین کمان توسط کیتوزان می باشد. البته با توجه به تلفات حدود ۴۰ درصد در ماهیان تیمار ۰/۲۵ درصد کیتوزان پس از یک هفته، بایستی اذعان داشت که کیتوزان علی رغم تحریک فاکتورهای ایمنی، قابلیت افزایش صددرصدی قدرت دفاعی بدن را در مواجهه با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با دُز تزریقی ذکر شده را ندارد.

مدت زمان استفاده از محرکهای ایمنی و مقادیر مورد استفاده از این مواد در عملکرد و تأثیر آنها بر سیستم ایمنی آبزیان دخالت دارد به گونه ای که بنابر گزارش Matsuo و Miyazano (۱۹۹۳) استفاده از پپتیدوگلوکان به مدت ۵۶ روز به صورت خوراکی در قزل آلای رنگین کمان باعث حمایت در برابر آلودگی به *Vibrio anguillarum* نگردید، در حالی که استفاده از این محرک به مدت ۲۸ روز باعث حمایت از این ماهی در برابر آلودگی به باکتری یاد شده گردید (۲۳). همچنین تزریق کیتین به ماهی دم زرد (*Seriola aqinqueradiata*) تنها در مدت زمان ۴۵ روز بر مقاومت این ماهی در برابر *Pasteurella piscicida* مؤثر می باشد و این اثر تا ۴۵ روز پس از تزریق این ماده به ماهی در بدن آن باقی می ماند (۲۰).

همان گونه که در جدول ۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است روند فعالیت لیزوزیم و گلوتاتیون پراکسیداز سرم خون قزل آلا طی هفته های نمونه برداری در تمام تیمارها به جز گروه شاهد سیر صعودی داشته است و این روند افزایشی در تیمار دوم نسبت به تمام تیمارهای دیگر قابل ملاحظه تر بوده است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که در این تحقیق تأثیر مقدار ۰/۲۵ درصد کیتوزان در مدت زمان هشت هفته (۵۶ روز) نسبت به مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد تأثیر بهتری بر روی پاسخهای ایمنی قزل آلای رنگین کمان داشته و باعث افزایش بیشتر مقاومت این گونه در برابر آلودگی با *آئروموناس هیدروفیلا* گردیده است (نمودار ۲).

هر چند دلیل کاهش پاسخهای ایمنی در ماهیان هنگام استفاده از مقادیر زیاد و طولانی مدت از محرکهای ایمنی به صورت خوراکی، هنوز به طور دقیق مشخص نشده است، اما با این حال احتمالا در چنین شرایطی یک سیستم فیدبک (Feed back) منفی در ماهیان در مقابل تحریک ایمنی بدن ایجاد شده و باعث برگشت پاسخهای ایمنی به جایگاه اول آن می گردد. بنابراین استفاده از مقادیر زیاد و به مدت طولانی از محرکهای ایمنی باعث کاهش اثر آنها می شود (۲۸) و شاید دلیل تأثیر کمتر مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان نسبت به مقدار ۰/۲۵ درصد در این تحقیق نیز همین امر باشد.

از آنجایی که احتمالاً کیتوزان در دستگاه گوارش آبزیان تأثیر خود را بر هضم و جذب مواد غذایی، در مقادیر کمتر

بهتر نشان می دهد (۱۵)، بنابراین در این تحقیق سعی بر آن شد تا از مقادیر کمتری از کیتوزان نسبت به محققین قبلی استفاده گردد تا با بهبود تغذیه ماهیان که در سلامت آنها تأثیر انکار ناپذیری دارد سیستم فیزیولوژی آنها در وضعیت مطلوب تری قرار گرفته و کیتوزان مصرفی بهتر بر روی سیستم ایمنی و مقاومت ماهیان تأثیر گزار شود. به همین منظور با توجه به اینکه بیشترین مقدار خوراکی کیتوزان که تا کنون به صورت مخلوط با غذا برای تغذیه آبزیان مورد استفاده قرار گرفته و نتیجه مطلوبی را در بر داشته ۱ درصد بوده و توسط Cha و همکاران (۲۰۰۸) بر روی گونه کپور معمولی اعمال شده است (۱۲)، لذا در این تحقیق مقادیر پایین تر از ۱ درصد (۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد) هم برای بررسی انتخاب گردید که با توجه به نمودار۲، مقادیر کمتر خصوصا مقدار ۰/۲۵ درصد نتایج بهتر و رضایت بخش تری را در مورد افزایش مقاومت گونه قزل آلای رنگین کمان در برابر آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا نشان داده است.

بنا بر گزارشهای محققین فوق مبنی بر تأثیر کیتوزان بر تقویت سیستم ایمنی ماهیان و افزایش مقاومت آنها در برابر آلودگیهای باکتریایی، و همچنین با توجه به تأثیر فزاینده کیتوزان بر فعالیت لیزوزیم و مقدار گلوتاتیون پراکسیداز سرم قزل آلای رنگین کمان در این تحقیق به نظر می‌رسد کیتوزان با نقش محرک ایمنی خود و تحریک پاسخهای ایمنی باعث مقاومت بیشتر این گونه در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا گردیده است. بنابراین جهت ارتقای سیستم ایمنی ماهی قزل آلا و آمادگی این گونه برای رویارویی با آلودگیهای احتمالی باکتریایی خصوصاً آلودگی با *Aeromonas hydrophila* و پیشگیری از ابتلا به بیماریهای باکتریایی در مزارع پرورش ماهی، پیشنهاد می شود از مقدار ۰/۲۵ درصد محرک ایمنی کیتوزان به صورت ترکیب با غذای این گونه و به مدت هشت هفته (۵۶ روز) استفاده گردد.

## منابع


۱. اکبری، پ.، حسینی، س ع.، ایمانپور، م ر.، سوداگر، م و شالویی، ف.، ۱۳۸۷. بررسی اثر ناپلئوسهای آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره و ویتامین C روی مقاومت در برابر تنشهایمحیطی دما و کمبود اکسیژن در لاروهای قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۱، شماره ۴، صفحات ۶۱۰-۶۰۰.

۲. چگنی، ح ر.، نظام اسلامی، ع.، احمدی فر، ا.، عظیمی، ع.، حسینی، س ع و جلالی، م ح.، ۱۳۸۹. بهینه سازی زمان تغذیه لاروهای قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از ناپلئوس آرتمیا و جیره تجاری. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره ۶، صفحات ۸۶۶-۸۵۸.

۳. حسینی، س ن.، سیف آبادی، س ج.، کلباسی، م ر و ویلکی، ا س.، ۱۳۸۱، تأثیر ماده ال – کارنیتین روی مراحل اولیه رشد و ترکیبات بدن قزل آلای رنگین کمان، مجله علوم دریایی ایران، شماره دوم. صفحات ۴۶-۴۱.

۴. عمادی، ح.، ۱۳۸۳. تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و آزاد. انتشارات علمی آبزیان. ۲۶۳ صفحه.

۵. فقانی، ط.، آذری تاکامی، ق.، قیاسی، م.، فقانی، س و احمدی فر، ا.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) . مجله شیلات. سال سوم. شماره دوم، صفحات ۱۴-۷.

۶. مخیر، ب.، ۱۳۸۵. بیماری های ماهیان پرورشی. چاپ پنجم. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۳۸ صفحه.

۷. مهرابی، ی.، ۱۳۷۸. مطالعه مقدماتی اثر بیهوش کنندگی پودر گل درخت میخک بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان. مجله پژوهش و سازندگی، شماره پیاپی ۴۰، ۴۱، ۴۲، صفحات ۱۶۲-۱۶۰.

۸. یوسفیان، م.، هدایتی فرد، م و صادقی فر، ح.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثرات زئولیت بر روی برخی فاکتورهای ایمنی و آنزیمی ماهی

کپور دریای مازندران، مجله شیلات، سال سوم، شماره چهارم، صفحات ۵۶-۴۵.

*Cryptocaryon irritans* infection of red seabream. Jornal of Fish Pathology, 30: 289–290.

20- Kawakami, H., Shinohara, N., Sakai, M., 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effect of *Vibrio anguillarom* bacterin, M-glucan, chitin or freund's complet adjuvant in yellowtail *Seriola aqinqueradiata* to *pasterorella piscicida* infection. Jornal of Fish Pathology, 33: 287-291.

21- Kim, S.K., Rajapakes, N., 2005. Enzymatic production biological activities of chitosan oligo-sacharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers, 62: 357-368.

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

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

24- Mesalhy, S., Mohamed, F. M., John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challeng infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research, 39: 674-656.

25- No, HK., Park, NY., Lee, SH., Meyers, SP., 2002. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. Jornal of Food Microbiology, 74: 65-72.

26- Peters, G.; Faisal, M.; Lang, T.; Ahmed, I. 1988. Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromons hydrophilic* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Disease of Aquatic Organisms, 4: 83-89.

27- Romoren, K., Thu, B. J., Evensen, O., 2002. Immersion delivery of plasmid DNAII, A study of the potential of a chitosan based delivery system in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* fry. Jornal of Controlled Release, 85: 215-225.

28- Sakai, M., 1998. Current research status of fish immunostimulants, Aquaculture 172, 63-92.

29- Shahidi, F., Vidana Arachchi, J. K., Jeon, Y. J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science and Technology, 10: 37-51.

30- Shalaby, A.M., Khattab, Y. A., Abdel Rahman, A. M., 2006. Effects of (*Allium sativum*) and

9- Aoki, T., 1992. 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, pp: 519–529.

10- Anderson, DP., Siwicki, AK., 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. The progressive Fish-Culturist, 56: 258-261.

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

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

13- Chen, D., Ainsworth, A.J., 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. Jornal of Fish Diseases, 15: 295–304.

14- Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish and Shellfish Immunology, 2: 287–297.

15- Gopalakannan, A., Arul, V., 2006. 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, 255:179-187.

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

17- Jorgensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B., 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon (*Salmo salar)*. Jornal of Fish Diseases, 16: 313–325.

18- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Jornal of Fish Pathology, 25: 93–98.

19- Kakuta, I., Kurokura, H., 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against

chloramphenicol on growth performance,physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 12: 172–201.

31- Siwicki, AK. Anderson, DP. Rumsey, GL., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Immunology and Immunopathology, 41: 125-139.

32- Tewary, A., Patra, B.C., 2008. Use of vitamine C as an immunostimulant.Effect on growth, nutritional quality and immune response of *Labeo rohita*. Fish Physiology Biochemistry, 34: 251-259.

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

# Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* and enhance resistance against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* fallowing experimental infection

**Tafi A.A.[1], Meshkini S.[2] and Tukmechi A.[3]**

**[1] Fishery Dept., , Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran**

**[2] Faculty of Veterinary Medicine and Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran**

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of Chitosan as an immune stimulator on rainbow trout immune response and enhanced resistance against *Aeromonas hydrophila* fallowing experimental infection. 900 rainbow trout (25.62±0.10 g initial mean weigh) were obtained and acclimatized with experimental conditions for 10 days. Then the fish were divided into four groups, the first one (control) just fed with normal diet (GFT-1) and other three groups served different doses of Chitosan (0.25, 0.5 and 1 percent) with their feed. The trial continued for eight weeks and every two weeks blood samples were taken for measuring plasma lysozyme activity and glutathione peroxidase. After that, an experimental infection conducted with a pathogenic *Aeromonas hydrophila* by intra peritoneal injection ($10^7$ CFU/ml). The fish were monitored daily and the mortality recorded during one weeks after infection. The plasma lysozyme activity and glutathione peroxidase were increased significantly in the group that was fed with 0.25 percent Chitosan in comparison the untreated control fish. Further more the fish resistance against *Aeromonas hydrophila* enhanced in this group. Base on this result, 0.25 percent Chitosan could enhance some immune response and resistance of rainbow trout against *Aeromonas hydrophila*.

**Keywords:** Rainbow trout, Chitosan, Lysozyme activity, Glutathione peroxidase, *Aeromonas hydrophila*