"مقاله پژوهشی"

مقایسه اثر استفاده از باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا به سه روش حرارت، فرمالین و اشعه ماوراءبنفش بر میزان بقاء، برخی از فاکتورهای خونی و ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

تقی محمدی فوتمی[۱]، رضا چنگیزی[۱*]، سیدمهدی حسینی فرد[۲*]، حسین خارا[۳]، رضا صفری[۴]

۱.گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۲. گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۳. گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۴.گروه تغذیه، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۱

چکیده

آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتری های مهم و شایع در امر پرورش ماهیان می‌باشد که متاسفانه شیوع و گسترش آن منجر به افزایش مصرف آنتی بیوتیک در تولید آبزیان شده است. لذا در مطالعه حاضر به منظور ارائه راحل و افزایش ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، به ۴ گروه ۲۰ تایی از ماهیان با ۳ تکرار برای هر گروه باکتری زنده و باکتری کشته شده آئروموناس هیدروفیلا به سه روش حرارت، فرمالین و UV بصورت تزریق درون صفاقی با غلظت ۱۰ به نمای ۵ سلول در میلی لیتر به ماهی معرفی شد. براساس نتایج، آنتی ژن باکتری کشته شده به روش فرمالین و UV موجب افزایش گلبول های سفید ($P<۰/۰۵$) و حفظ گلبول های قرمز شده است. همچنین سطح ایمنوگلوبین نوع M و کمپلمان ۳و ۴ در این دو گروه نسبت به گروهی که در معرض باکتری زنده و باکتری کشته شده به روش حرارت قرار داشتند، شرایط بهتری داشت. لذا براساس نتایج با استفاده از باکتری‌های کشته شده آئروموناس هیدرو فیلا به روش فرمالین و UV می‌توان انتظار افزایش ایمنی ماهی را داشت.

کلمات کلیدی: آئروموناس هیدروفیلا، قزل آلای رنگین کمان، ایمنی، ایمنوگلوبین

*عهده دار مکاتبات changizi@baboliau.ac.ir, hoseinifard@baboliau.ac.ir

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

مقدمه

نظر به محدودیت شرایط و زیرساخت‌های طبیعی درگسترش صنعت پرورش ماهیان سردآبی ایران، ناگزیر به افزایش بهره برداری از منابع مساعد آب و خاک جهت پرورش این آبزی می‌باشیم. لازمه این کار، افزایش تراکم تولید بعنوان یکی از روش‌های افزایش بازده تولید می‌باشد. اما این امر ممکن است ابتلا به بیماری را در ماهی پرورشی به سبب پایین آمدن کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس‌زا افزایش دهد (Gatlin *et al.*, 2007). اغلب ماهیان پرورشی زمانی که تحت تأثیر عفونت های باکتریایی قرار می-گیرند سیستم ایمنی شان در شرایط استرس‌زا به خطر می‌افتد. لذا اغلب اوقات پرورش‌دهندگان به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها تمایل پیدا کنند. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با مخالفت‌های شدیدی روبه رو شده است. زیرا این مواد اثرات مخربی و بلند مدتی بر محیط‌زیست و مصرف‌کننده نهایی می‌گذارد. به هر حال استفاده بلندمدت از این مواد می‌تواند باعث به وجود آمدن مقاومت باکتریایی شود و همچنین در دوزهای بالاتر نیز می‌تواند تأثیر منفی بر روی رشد و سایر فاکتورهای ایمنی داشته باشد (Verschuere *et al.*, 1999; Sealey*et al.*, 2015). از این رو علاقه‌مندی وسیعی در معرفی جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش استفاده از آن‌ها به وجود آمده است که تحریک سیستم ایمنی می‌تواند یکی از این موراد باشد (Harikrishnan *et al.*, 2011). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد محرک‌هایی مانندگلوکان، لاکتوفرین، کیتین، کیتوزان و لوامیزول باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی و میگو می‌شوند. فاکتورهای تغذیه-ای نظیر ویتامین ب، ث و برخی هورمونها مانند هورمون رشد و پرولاکتین نیز به عنوان محرک ایمنی گزارش شده‌اند (Liu *et al.*, 2010). این محرکها سبب تسهیل عمل بیگانه خواری سلولهای فاگوسیت کننده و افزایش فعالیت ضد باکتریایی آنها می شوند (Kakuta and Kurokura, 1995). در این خصوص رحمتی و همکاران (۱۳۹۰) از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی کپورمعمولی در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده نمودند. براساس نتایج گزارش شده این مسئله سبب بهبود پارامترهای رشد و مقاومت باکتریایی در آن‌ها شده است. همچنین در مطالعه مشابه‌ای، جعفریان و همکاران (۱۳۹۰) با استفاده از باسیلوس‌های جدا شده از ماهیان خاویاری توانستند رشد و بقا لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در برار استرس‌های شوری، حرارت و اسیدیته افزایش دهند.

از این رو با توجه تغییر سیاست در مصرف آنتی بیوتیک‌ها برای آبزی‌پروری و نیاز به توسعه راهکارهای جایگزین در جهت کنترل بیماری‌ها در مطالعه حاضر در نظر داریم امکان بهبود سیستم ایمنی ماهی قزل آلای‌رنگین‌کمان را با استفاده از سویه‌های ضعیف شده آئروموناس هیدروفیلا به روش‌های مختلف مورد بررسی قراردادیم و درصورت حصول نتایج مطلوب بعنوان راهکار جایگزین برای استفاده از آنتی بیوتیک‌ها معرفی نماییم.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

جهت انجام این تحقیق، تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین‌کمان در ۱۲ تانک پرورشی با حجم آب حدود ۳۰۰ لیتر با تراکم ۶۰ عدد ماهی در هر واحد پرورشی با میانگین وزنی ۴ گرم مورد بررسی

قرارگرفت. به منظور کاهش استرس ناشی از انتقال ماهیان به مدت ۴۸ ساعت قبل از انتقال به واحد آزمایشی غذادهی نشدنشد و در طول دوره آزمایش به مدت ۲۰ روز با غذای معمول تغذیه شد. به منظور بررسی ایمنی زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا، باکتری‌های غیر فعال شده به روش‌های حرارت، فرمالین و اشعه ماورای بنفش در روز ۲۰ پرورش با غلظت۱۰ به نمای ۵ سلول/میلی لیتر/ ماهی در سفاق ماهی تزریق شد. بنابراین مطالعه حاضر با چهار تیمار و سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در پایان دوره پرورش آزمایشی پس از ایمن سازی میزان بقا، فاکتورهای خونی، ایمنوگلوبین (M)، سطح کمپلمان C3 و C4 مورد ارزیابی قرار گرفت.

سویه‌باکتری‌بیماریزای

پس از تهیه سویه بیماریزای آئروموناس هیدروفیلا به صورت رشد یافته از موسسه‌ی تحقیقاتی و سرم‌سازی رازی، در شرایط استاندارد بر روی محیط مغذی تریپتون سویا آگار (TSA) به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد. سپس استوک باکتریایی در محیط کشت تریپتون سویا براث (TSB) در انکوباتور شیکردار در دمای۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت گردید و براث حاصل نیز پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ، ذخیره‌ی باکتریایی لازم پس از دو بار شستشو با محلول بافر فسفات نمکی (pH: ۷/۲) تهیه گردید (Joseph and Carnahan, 1994). به منظور تأیید بیماری‌زا بودن سویه مورد نظر میزان ۵۰ LD آن در آزمایشی به صورت تزریق درون صفاقی $^{-۵}$ ۱۰ تعیین گردید.

تهیه باکتری کشته شده

فرمالین: محلول حاوی باکتری بعد از شمارش با هموسیتومتر، فرمالین به میزان ۳٪ به حجم محلول حاوی باکتری اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. در ادامه پس از شستشو و سانتریفیوژ بامحلول بافر فسفات نمکی تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۳ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد (Akhlaghi, 2002).

حرارت: محلول حاوی باکتری بعد از شمارش با هموسیتومتر در حمام آب‌گرم با دمای ۶۰ درجه‌سانتی-گراد به مدت ۴ ساعت قرارگرفت و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۳ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد (Akhlaghi, 2002).

UV: در این روش ابتدا سوپرناتانت حاوی باکتری به منظور شمارش تراکم باکتری با روش هموسیتومتری مورد ارزیابی قرارگرفت و سپس محلول در فاصله ۳۰ سانتی متری لامپ UV با توان ۱۵ وات به مدت ۲ ساعت و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت تاثیر تابش پرتو قرارگرفت (Campos-Perez *et al.*, 1997).

در پایان مراحل کشته شده باکتری با هر یک از روش‌های فوق، یک نمونه از آنها به منظور تایید کشته شدن باکتری در محیط کشت تست‌گردید و پس از تایید کشته شدن باکتری مورد استفاده قرارگرفتند.

سنجش فاکتورهای شمارشی خون

در پایان دوره‌ی آزمایش ماهیان بازمانده از هر تیمار صید و پس از خون‌گیری از رگ ساقه دمی، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون پس از رقیق‌سازی خون با استفاده از لام هماتوسیتومتر شمارش‌گردید

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

(Houston, 1997). شمارش کلی گلبول‌های قرمز و سفید ماهی به روش دستی و با استفاده از لام نئوبا رصورتگرفت. برای اینکار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق کننده نات–هریک استفاده شد. همچنین برای اندازه‌گیری هموگلوبین از کیت سنجش هموگلوبین ساخت شرکت زیست شیمی تهران و هماتوکریت مورد سنجش قرارگرفت. برای این منظور پس از مخلوط نمودن ۲۰ میکرولیتر خون با ۵ سی‌سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانو مت هموگلوبین) با یک وقفه ۵ دقیقه‌ای با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب نوری، محلول فوق در طول موج ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک معرف قرائت گردید. سپس میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر با استفاده از فرمول، طبق دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه شد. بررسی هماتوکریت نیز با روش میکروهماتوکریت صورت پذیرفت (حافظ امینی و عریان، ۱۳۸۱). سایر شاخص‌های خونی با استفاده از رابطه‌های استاندارد طبق منبع موجود براساس رابطه ریاضی محاسبه گردید (Gohari *et al.*, 2010).

سنجش فاکتور ایمنی خون

در انتهای دوره آزمایشی پس از یک روز قطع غذادهی، ۵ عدد ماهی از هر تکرار بصورت تصادفی انتخاب و پسس ار بیهوشی در عصاره گل میخک با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر (Velisek *et al.*, 2005) و خشک نمودن بدن از آب و موکوس اضافی از ساقه دمی اقدام به اخذ نمونه‌های خون شد. نمونه‌ها در مجاورت یخ به اپندروف‌های فاقد ماده ضد انعقاد انتقال داده و در آزمایشگاه با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید. برای اندازه‌گیری سطح سرمی کمپلمان‌های C4 و C3 از کیت مخصوص و روش کدورت سنجی ایمنی استفاده شد. برای این منظور از دستگاه اسپکتووفتومتر با طول موج ۳۶۰ نانو متر استفاده شد. IgM سرم بر حسب میلی‌گرم در دسی لیتر بوسیله دستگاه نفلومتری Minineph (Binding site – انگلستان) و با استفاده از کیت آزمایشگاهی Binding site به روش نفلومتری اندازه‌گیری شد.

نتایج

دامنه‌ی‌تغییرات فاکتورهای شمارشی خون درجدول ۱ ارائه شده است. براساس نتایج پس از تزریق باکتری آئروموناس هیدروفیلابه تیمارهای آزمایشی مقادیر گلبول‌قرمز،گلبول‌سفید، هموگلوبین، هماتوکریت در گروهایی که از فرمالین و UV برای کشتن باکتری استفاده شده بود افزایش یافت. بطوریکه با دوگروه دیگر (دما و شاهد) از لحاظ آماری داری اختلاف معنی‌داری بوده است (P<۰/۰۵). التهٔ مقدار گلبول-های‌سفید در تیمار حرارت با شاهد نیز داری اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به فاکتورهای ایمنی در جدول ۲ ارائه شده است. هر سه فاکتور ایمنی در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد متفاوت و معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

در بررسی تلفات ماهیان تیمارهای مورد آزمایش پس از معرفی باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۸۳/۳۳ درصد ماهیان گروه شاهد تا روز بستم تلف شدند. که نتایج آن را در شکل ۱ ارائه شده است. درحالیکه در تیمارهای آزمایش این مقدار بسیار کمتر بود. بطوریکه در تیمار UV کمترین میزان تلفات مشاهده شد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

جدول ۱: تاثیر روش‌های مختلف غیر فعال سازی باکتری آئروموناس هیدروفیلا بر فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (میانگین **±S.E**)

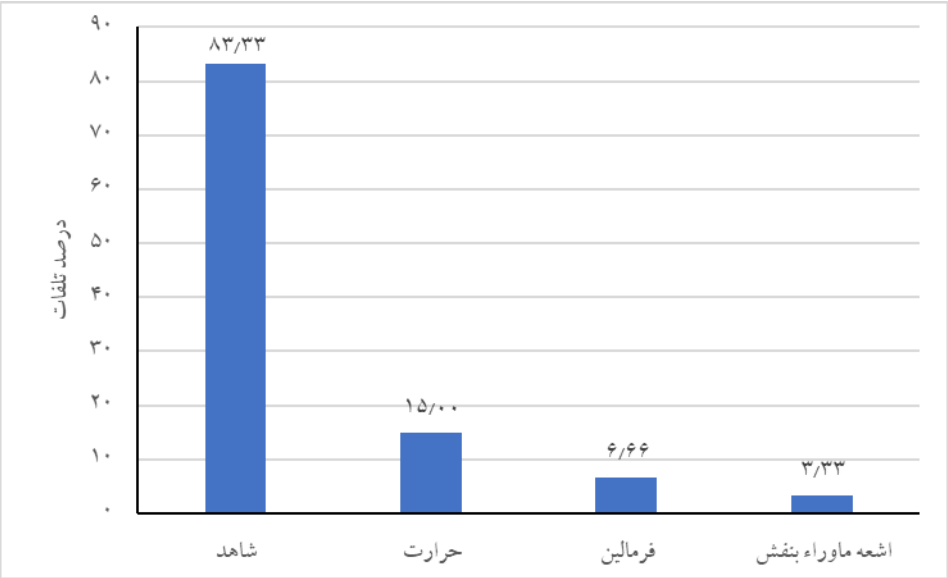
فاکتور های شمارشی خون	تیمار های آزمایشی			
	شاهد	حرارت	فرمالین	**UV**
گلبول‌قرمز ($10^6 mL^{-1}$)	۱/۱ 0±۰/۰۸^{a}	۱/۱۳± ۰/۰۵^{a}	۱/۲۴ ± ۰/۰۷^{b}	۱/۲۵ ± ۰/۰۶^{b}
گلبول سفید ($10^3 mL^{-1}$)	۱۰/۶ ± ۰/۱۱^{a}	۱۲/۳± ۰/۲۳^{b}	۱۵/۸± ۰/۳۶^{c}	۱۵/۱± ۰/۲۹^{c}
هموگلوبین (gdL^{-1})	۶/۴ ± ۰/۳۰^{a}	۶/۶۸± ۰/۱۱^{a}	۷/۷۷± ۰/۵۳^{b}	۷/۸۱± ۰/۲۷^{b}
هماتوکریت (٪)	۲۶/۸۳ ±۱/۴۷^{a}	۲۷/۶۷± ۰/۸۱^{a}	۳۰/۶۷±۱/۶۳^{b}	۳۰/۶۷±۱/۹۶^{b}
متوسط حجم گلبول قرمز (fL)	۲۴۳/۱۸±۵/۸۶^{a}	۲۴۵/۰۲±۵/۱۴^{a}	۲۴۷/۷۳±۴/۲۸^{a}	۲۴۵/۵۹±۴/۷۲^{a}
متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (Pg)	۵۸/۰۳±۲/۵۲^{a}	۵۹/۲۲±۱/۸۵^{a}	۶۲/۶۸±۱/۵۸^{b}	۶۲/۶۸±۱/۴۲^{b}
متوسط غلظت هموگلوبین گلبول قرمز(gdL^{-1})	۲۳/۸۵± ۰/۷۲^{a}	۲۴/۱۵± ۰/۴۶^{a}	۲۵/۳۲± ۰/۴۳^{b}	۲۵/۵۳± ۰/۸۲^{b}

وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲: تاثیر روش‌های مختلف غیر فعال سازی باکتری آئروموناس هیدروفیلا فاکتورهای ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (میانگین **±S.E**)

فاکتورهای ایمنی	تیمار های آزمایشی			
	شاهد	حرارت	فرمالین	**UV**
ایمنوگلوبین نوع M (IgM) (mg dL-1)	۶۶/۶ ±۱/۴۸^{a}	۹۲/۰۵± ۲/۳۵^{b}	۱۲۱/۲۵ ± ۴/۲۷^{c}	۱۱۴/۰۳ ± ۵/۱۶^{c}
کمپلمان ۳ (C3) (mg dL-1)	۲۳/۱۷ ± ۰/۹۰ ^{a}	۲۲/۸۵± ۱/۱۵^{a}	۳۳/۵۲± ۱/۹۳^{b}	۳۷/۲۸± ۲/۸۷^{b}
کمپلمان ۴ (C3) (mg dL-1)	۵/۶۸ ±۰/۷۸ ^{a}	۹/۴۵± ۰/۶۵^{b}	۱۲/۲۳ ± ۰/۷۷^{c}	۱۳/۲۲ ± ۰/۴۶^{c}

* اعداد دارای حروف غیر یکسان در هر ردیف دارای اختلاف آماری معنی دار در سطح $P<0.05$ می‌باشد.



شکل ۱: درصد تلفات در گروه‌های مختلف آزمایشی تا بیست روز پس از معرفی باکتری آئروموناس هیدروفیلا به ماهی قزل-آلای رنگین کمان

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

بحث

همانگونه که در مقدمه به آن اشاره شد، باکتری آئروموناس هیدروفیلا یکی از عوامل بیماری زا باکتریایی شناخته شده در آبزیان می‌باشد که به عنوان عامل سپتی سمی هموراژیک شناخته شده‌است (Akhlaghi, 2000). لذا در مراحل پیشرفته بیماری با آسیب‌های جدی که به بافت‌های مختلف موجود وارد می‌کند، منجر به بروز اختلالات فیزیولوژیک و برهم خوردن هموستازی خواهد شد. مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری را به عواملی نظیر آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز، الاستاز و ... ، انتروتوکسین‌های سمی درون سلولی و آئرولیزین مترشحه از باکتری نسبت می‌دهند.

درمطالعه حاضر تاثیر باکتری کشته شده به روش‌های مختلف در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. براساس پیشینه تحقیق باتوجه به تاثیر بیشتر استفاده از روش تزریق نسبت به سایر روش‌های مرسوم این روش برای انجام مطالعه استفاده شد (پیغان و همکاران، ۱۳۸۶). براساس نتایج می‌توان به میزان تلفات در گروه شاهد (۸۳/۳۳ درصد) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود، که موید تاثیر روش‌های مورد استفاده در غیر فعال سازی باکتری می‌باشد.

درادامه بیست روز پس از معرفی باکتری به گروه-های آزمایشی، فاکتورهای شمارشی خون مورد ارزیابی قرارگرفتند، که براساس نتایج بطور معنی‌داری تحت تاثیر قرارگرفتت. مطابق انتظار و نتایج مطالعات موجود در این زمینه، تعداد سلول‌های قرمز خون و متعاقب آن هموگلوبین و هماتوکریت در گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت، که شاخص بارز کم خونی در این گروه از ماهیان می‌باشد. البته این موضوع در گروهی از ماهیان که در معرض باکتری‌های حرارت دیده قرار داشتند، نیز مشاهده شد. لذا ممکن است حرارت یا روشی که ما برای این امر در نظر گرفتیم امکان غیر فعال کردن این باکتری را نداشته باشد. در مقابل در دوگروه دیگر که ار فرمالین و UV برای غیر فعال سازی باکتری‌ها استفاده شد، تعداد گلبول‌های قرمز به مقدار قابل توجهی، که از لحاظ آماری نیز معنی دار بود، در سطوح بالاتری قرارداشت. کاهش تعداد سلول-های قرمز خون را می‌توان به آئرولیزین مترشحه از این باکتری که یک پروتئین سمی همولیتیک است مرتبط دانست (Parker *et al*., 1994). براساس یافته‌های سایر محققین، متصل شدن این پروتئین به گلیکو فسفاتیدیل اینوزیتول درسطح سلول‌های قرمز خونی و نفوذ به درون غشای سلولی سبب متلاشی شدن سلول می‌شود. در نتیجه در گروه شاهد و گروه ۲ (حرارت) به دلیل همولیز شدن گلبول قرمز شاهد کاهش در تعداد آن‌ها بودیم. با توجه به اینکه یک گلبول قرمز اساسا شامل غشایی است که محلولی از همو گلوبین را در بر می-گیرد (هموگلوبین حدود ۹۵٪ پروتئین داخل سلولی گلبول قرمز را شامل می‌گردد) از این رو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول‌های قرمز رابطه ای منطقی می‌باشد.

درخصوص گلبول‌های سفید نتایج مشابهی با گلبول قرمز مشاهد گردید. اینگونه بیان شده که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی بادی‌ها در ارتباط است (Irianto and Austin, 2002). چرا که برخی عوامل سلولی از قبیل فاگوسیتوزیس گلبول‌های سفید (Jones *et al*., 1993) و فعالیت لنفوسیت‌ها (Anderson *et al*., 1982) نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی‌ها ایفا

می‌نماید. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبول‌های سفید انسان توسط باکتری های اسید لاکتیک موجوداست (Oyetayo *et al*., 2005)، بعلاوه Aattouri و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که الحاق باکتری‌های اسید لاکتیک به موش موجب افزایش لنفوسیت‌ها می‌شود. آن‌ها مطرح کردند که آثار مفید این عمل منجر به افزایش مقاومت موش در برابر عفونت‌ها می‌گردد. آنتی ژن‌های آئروموناس هیدروفیلای غیر فعال شده ممکن است از طریق فعال سازی لنفوسیت‌ها به افزایش پاسخ ایمنی موجود آبزی منجر گردد. مطالعات Irianto و Austin (۲۰۰۲) این نظریه را که تحریک سلولی (یعنی افزایش لنفوسیت ها گلبول سفید و کل تعداد ماکروفاژها و افزایش بیگانه خواری) بیشتر از ایمنی همورال دارای اهمیت می‌باشد را تایید می‌کند. همچنین Brunt و Austin (۲۰۰۵) نشان دادند که ماکروفاژهای تیمار پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد توانایی بیشتری برای بیگانه خواری دارند . نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد. در مطالعه Irianto و Austin (۲۰۰۲) که از پروبیوتیک برای کنترل عامل بیماری فرونکلوزیس در قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده نمودند، تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمار هایی که از پروتیوبیک تغذیه کرده بودند افزایش یافت.

درتحقیق حاضر میزان IgM و سطح سرمی کمپلمان-های C4 و C3، تحت تاثیر روش‌های مختلف غیر فعال سازی باکتری قرار داشت. براساس نتایج اثر باکتری-های غیرفعال شده به روش فرمالین و UV نسبت روش حرارت بیشتر بوده و این اختلاف از لحاظ آماری نیز معنی‌داری می‌باشد. در این خصوص باید اظهار داشت که سیستم ایمنی غیر اختصاصی توسط پروبوتیک‌ها تحریک می‌گردد (Pérez *et al*., 2006).از آنجاکه باکتری‌های پروبیوتیکی تولید آنتی بادی را در انسان تحریک می‌کنند (Malin *et al*., 1996)، پس می‌توان انتظار داشت که سطح IgM تحت تاثیر تیمارها باشدT که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. اما همانطور که پیش‌تر به آن اشاره شده به دلیل تاثیر مخرب حرارت بر آنتی ژن‌های باکتری میزان این پارامترها در این گروه نسبت به دو گروه دیگر در سطوح پایین‌تری قرار داشت.

در تهیه واکسن و ایجاد ایمنی در ماهیان مشخص بودن تعداد باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از این رو در مطالعه حاضر براساس سوابق موجود (Loghothetis and Austin., 1994) از غلظت ۱ به نمای ۵ سلول باکتری به ازای هر گرم وزن ماهی مورد استفاده گردید. لازم به ذکر است که عامل اصلی تحریک فاکتورهای ایمنی آنتی ژن‌های باکتری می-باشد. لذا در فرآیند غیر فعال سازی هرچه آنتی ژن‌ها بدون تغیر باقی بمانند این امر میسر خواهد شد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه تاثیر استفاده روش فرمالین و UV برای این موضوع مشهود تر بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله از کلیه کسانی‌که ما را در انجام این پژوهش یاری‌نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱. جعفریان، ح.ا.، سلطانی، م.، طاعتی، م.، نظرپور، ع.ر. و مروت، ر.ا.، ۱۳۹۰. مقایسه تاثیر باسیلوسهای مستخرج از روده لارو ماهیان خاویاری با

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

پروبیوتیکهای تجاری بر رشد و بقاء لارو ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۶ (۱)، ۳۹ تا ۴۶.

۲. رحمتی اندانی، ح.ر.، توکمهچی، ا.، مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰. افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری با استفاده از لاکتوباسیلوسهای جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران، ۷(۲)، ۲۶ تا ۳۵.

۳. حافظ امینی، م.و عریان، ش. ۱۳۸۱. بررسی اثرات ناشی از تنش کلرورسدیم روی هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران. ۱۱(۳)، ۱۳-۲۲.

4. Akhlaghi, M., 2000. Immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus* carpio, L.). Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 55(1), 57-62.
5. Akhlaghi, M., Vafaei, S., 2002. Pathogenicity of Aeromonas hydrophila in aquarium fish. Iranian Journal of Veterinary Research, 3(1), 82-87.
6. Aattouri, N., Bouras, M., Tome, D., Marcos, A. and Lemonnier, D., 2002. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon-γ production. British Journal of Nutrition, 87(4), 367-373.
7. Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Dixon, O.W., 1982. Immunosuppression induced by a corticosteroid of an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered in a *Yersinia ruckeri* bacterin. Developmental and Comparative Immunology, 197-204.
8. Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of fish diseases, 28(12), 693-701.
9. Campos-Pérez, J.J., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 1997. Visitation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity. Fish & Shellfish Immunology, 7, 555-566.
10. Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Braown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealy. W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aqua feeds: a review. Aquaculture Research 38, 551-579.
11. Gohari, M., Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., 2010. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry tissues, using bacterial culture, simple PCR and nested PCR, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 30(5), 177–184.
12. Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011. Fish health aspects in grouper aquaculture. Aquaculture, 320(1), 1-21.
13. Joseph, S.W., Carnahan, A., 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. Annual Review of Fish Diseases, 4, 315-343.
14. Houston, A.H., 1997. Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health?. Transactions of the American Fisheries Society, 126(6), 879-894.
15. Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of fish diseases, 25(11), 633-642.
16. Kakuta, I., Kurokura, H., 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red seabream. Jornal of Fish Pathology, 30, 289–290.
17. Liu K., Chiu C., Shiu Y., Cheng W. and Liu C., 2010. Effects of the probiotic, Bacillus subtilis E20, on the survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish and Shellfish Immunology, 28:837-844.
18. Loghothetis, P.N., Austin, B. 1994. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to Aeromonas hydrophila. *Fish and Shellfish Immunology*, 4, 239-254.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]

19. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M. and Isolauri, E., 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. Annals of Nutrition and Metabolism, 40(3), 137-145.
20. Oyetayo, V.O., Oyetayo, F.L., 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. African Journal of biotechnology, 4(2), 123-127.
21. Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F. and Tsernoglou, D., 1994. Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. Nature, 367(6460), 292-295.
22. Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I. and Múzquiz, J.L., 2010. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. Mucosal immunology, *3*(4), 355-360.
23. Sealey, W.M., Conley, Z.B. and Bensley, M., 2015. Prebiotic supplementation has only minimal effects on growth efficiency, intestinal health and disease resistance of west slope cutthroat trout O*ncorhynchus clarkiilewisi* fed 30% soybean meal. Frontiers in immunology, 6, 396.
24. Velisek J., Svobodova Z., Piackova V. (2005): Effect of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Veterinaria Brno, 74, 139–146.
25. Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 1999. Microbial Control of the Culture of Artemia Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. Appl. Environ. Microbiol., 65(6), 2527-2533.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-10-21]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.3.8.7]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.3.101]