اثرات مسمومیت تجربی با کلرپیریفوس بر ایمنی غیراختصاصی و مصونیت در برابر عفونت آئرومونازیس (*Aeromonasis*) در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **سعید مرادی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **کامران رضایی‌توابع***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره یکی از آلاینده‌های شیمیایی آب‌های سطحی هستند که ممکن است موجب افزایش استعداد ابتلا به بیماری در ماهیان شوند. از این‌رو در آزمایش حاضر اثرات مسمومیت تحت حاد کلرپیریفوس بر عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجه با عفونت آئرومونازیس مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۱۸۰ ماهی با میانگین وزن ٤٢ گرم بین ٤ گروه آزمایشی (۳ تکرار) شاهد، دوز پایین (۲/۵ میکروگرم بر لیتر)، دوز متوسط (۵ میکروگرم بر لیتر) و دوز بالای کلرپیریفوس (۱۰ میکروگرم بر لیتر) تقسیم شدند و به‌مدت ۱۰ روز تحت تاثیر تیمارهای فوق قرار گرفتند. در پایان، خونگیری جهت سنجش شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی انجام شد و ماهیان به‌وسیله تزریق درون صفاقی دوز کشنده *Aeromonas hydrophila* به‌مدت ١٤ روز تحت چالش باکتریایی قرار گرفتند. بررسی شاخص‌های خون‌شناسی، نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و درصد لنفوسیت‌های خون در ماهیان تحت تیمار با بالاترین دوز کلرپیریفوس بود (P<۰/۰۵). ارزیابی شاخص‌های ایمنی خون گواه از کاهش معنی‌دار ایمونوگلوبیولین تام، لیزوزیم، کمپلمان، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در بالاترین دوز کلرپیریفوس بود (P<۰/۰۵). میزان مرگ و میر تجمعی ماهیان در چالش با *Aeromonas hydrophila* رابطه مستقیمی با افزایش دوز کلرپیریفوس نشان داد اما فقط گروه آزمایشی بالاترین دوز با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، این چنین استنباط می‌شود که افزایش غلظت محیطی کلرپیریفوس موجب اثرات زیان‌آور بر سیستم دفاعی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و مقاومت آن را در مواجه با باکتری‌های بیماریزا کاهش می‌دهد.

کلمات کلیدی: کلرپیریفوس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، آئرومونازیس، ایمنی غیر اختصاصی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: krtavabe@ut.ac.ir

مقدمه

ازجمله عوامل اصلی مانع توسعه آبزی‌پروری و هم‌چنین انقراض گونه‌های آبزی مستقر در یک اکوسیستم طبیعی شیوع بیماری‌های عفونی هستند(Gobi و همکاران، ۲۰۱۸؛Dietrich و همکاران، ۲۰۱۴). در میان عوامل بیماریزا، باکتری‌ها به‌عنوان عمده‌ترین عامل محدود کننده تولید در اکوسیستم‌های طبیعی و محیط پرورشی محسوب می‌شوند (اسدی و همکاران، ۱۳۹۴). عفونت آئروموناد متحرک احتمالاً شایع‌ترین بیماری باکتریایی ماهی‌های آب شیرین محسوب می‌شودو *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان یک باکتری همیشه حاضر و فرصت‌طلب، یکی از اصلی‌ترین مشکلات مزارع پرورشی ماهی است (Feckaninova و همکاران، ۲۰۱۷؛ احمدی و همکاران، ۱۳۹۰؛ آهنگرزاده و همکاران، ۱۳۹۴). توسعه بیماری در آبزیان نتیجه واکنش بین سه عامل بیماریزا، میزبان و محیط است (پاک‌روان و همکاران، ۱۳۹۶). از همین رو توجه به شرایط محیط زیست ماهی و از بین بردن عوامل استرس‌زا، ازجمله آلودگی‌های محیطی در جلوگیری از بروز بیماری توسط پاتوژن‌ها، بویژه عوامل فرصت‌طلب بسیار حائز اهمیت است. اکوسیستم‌های آبی به‌شدت تحت تأثیر فاضلاب‌های صنعتی،شهری و کشاورزی قرار گرفته‌اند. آلاینده‌های شیمیایی به‌عنوان عوامل استرس‌زا زیستی در آبزیان عمل می‌کنند و اثرات زیان‌آوری بر سلامت آن‌ها بر جای می‌گذارند(Benjam و همکاران، ۲۰۱۰).آفت‌کش‌ها، به‌دلیل استفاده گسترده در بخش کشاورزی، به‌منظور افزایش تولید از طریق حذف موجودات ناخواسته و کنترل حامل‌های بیماری، ازجمله مهم‌ترین منابع شیمیایی آلاینده محیط زیست محسوب می‌شوند که به طرق مختلف به منابع آب‌های سطحی ازجمله رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و تالاب‌ها وارد می‌شوند و غالباً موجودات غیرهدف ازجمله ماهی و میگو را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Banaee و همکاران، ۲۰۱۱؛ Agrahari و همکاران، ۲۰۰۷؛ Yonar، ۲۰۱۳). برآوردها نشان می‌دهد که فقط ۰/۱ درصد از این مواد به آفات هدف می‌رسند و ۹۹/۹ درصد باقی‌مانده به سایر اجزای محیط‌زیست راه می‌یابند (Tripathi و Shasmal، ۲۰۱۱). یکی از پرکاربردترین انواع آفت‌کش‌ها که در حال حاضر در بخش کشاورزی استفاده می‌شود، سموم ارگانوفسفره هستند که برای گونه‌های غیر هدف، ازجمله پستانداران، پرندگان و آبزیان نیز اثرات سمی دارند (Yonar و همکاران، ۲۰۱۴). کلرپیریفوس (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) یکی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره است که برای کنترل آفات درختان میوه، غلات و همین‌طور برای مقابله با آفات بیماری‌زای چهارپایان نیز استفاده می‌شود(فرمان‌زاده و رضایی‌نژاد، ۱۳۹۶). این آفت‌کش موجب مهار آنزیم کولین‌استراز در پایانه‌های سیناپسی سمپاتیک و پاراسمپاتیک می‌شود که تجمع انتقال دهنده عصبی استیل کولین در سیناپس‌های عصبی و تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک را در پی دارد. حاصل این رخداد،اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (اسفندیار و همکاران، ۱۳۹۵). البته اثرات زیان‌آور سموم ارگانوفسفره بر آبزیان به موارد مذکور محدود نمی‌شود، بلکه طیف وسیعی از تاثیرات غیر کولینرژیک نیز توسط محققین مختلف برای این دسته از آفت‌کش‌ها گزارش شده است (Deb و همکاران، ۲۰۱۳). به‌عنوان مثال اثراتی هم‌چون بروز استرس اکسیداتیو،افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی توسط اسفندیار و همکاران (۱۳۹۵)، اختلال در سیستم غدد درون‌ریز از طریق تغییر در فعالیت ۱۷- بتا استرادیول و کورتیزول به‌واسطه عملکرد شبه‌استروژنی و تغییر فیدبکی در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز توسط Dogan و Can (۲۰۱۱)، آسیب ژنوتوکسیک و شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش توسط فارسانی و همکاران (۱۳۹۵)، صدمات بافتی با علائمی هم‌چون پرخونی عروق، پرخونی سینوزوئیدها، واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها، دژنراسیون هپاتوسیت‌ها و پیکنوزه شدن هسته‌ها در بافت کبد توسط فرخی و همکاران(۱۳۹۴) گزارش شده‌است.باوجود این‌که تاثیرات آفت‌کش‌های ارگانوفسفره بر ماهی‌ها توسط محققین مختلف به‌طور گسترده مورد ارزیابی قرار گرفته است، اما اثرگذاری آن‌ها بر حساسیت ماهی‌ها به بیماری، به‌ندرت مورد توجه قرار گرفته است. مصرف کلرپیریفوس به علت اثرات مضر آن بر جوامع غیر هدف، توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا محدود شده است، اما علی‌رغم این‌که مقدار مصرف آن به‌طور دقیق مشخص نیست ولی براساس گزارشات موجود میزان مصرف آن در کشورهای در حال توسعه هم‌چنان بالاست (نقشبندی و عسکری حصنی، ۱۳۹۶) و در ایران نیز یکی از آفت‌کش‌های پرمصرف می‌باشد (خدادادی و همکاران، ۱۳۸۸). استفاده زیاد از کلرپیریفوس،هوا،آب‌های زیرزمینی، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و آب باران را آلوده می‌کند و آلودگی حاصل تا ۲۴ کیلومتری محل استفاده نیز یافت می‌شود (رفیعیان و همکاران، ۱۳۹۵). یافته‌ها نشان می‌دهد که غلظت کلرپیریفوس در رودخانه‌ها و دریاچه‌ها در اثر استفاده مستقیم از آن در بدنه‌های آبی جهت کنترل پشه‌ها و یا ورود پساب کشاورزی مزارع تحت تیمار با این آفت‌کش تا ۴/۳ میکروگرم بر لیتر می‌رسد. البته در برخی مناطق دنیا غلظت این آفت‌کش در آب‌های سطحی تا ۱۰/۸ میکروگرم بر لیتر نیز نشان داده شده است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۷). کارکرد درست سیستم ایمنی ماهیان در زمان مواجه با چالش‌های زیست محیطی بسیار مهم است زیرا اختلال در سیستم ایمنی می‌تواند موجب افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی و مرگ و میر ماهیان شود (Gobi و همکاران، ۲۰۱۸؛ Shelley و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به این‌که سیستم ایمنی ماهیان به‌طور مداوم تحت تاثیر تغییرات

دوره‌ای و ناخواسته محیطی قرار می‌گیرد و هر گونه تغییر ناخواسته محیطی می‌تواند به‌صورت استرس حاد یا مزمن سلامت ماهی را به‌خطر اندازد، بدین سبب ارزیابی توان اثرگذاری سموم بر سیستم ایمنی آبزیان جهت آگاهی از حد مجاز مصرف و محدودسازی کاربرد آن‌ها با هدف رسیدن به معیارهای قابل اعتماد برای حفاظت از منابع آبزیان امری ضروری می‌باشد. به نقل از Dietrich و همکاران (۲۰۱۴) تغییرات در عملکرد سیستم ایمنی می‌تواند از طریق بررسی عملکرد ایمنی سلولی و یا سنجش تراکم و عملکرد اجزای دفاعی ذاتی مانند پروتئین‌های ضدمیکروبی سنجش شود. هم‌چنین آزمون چالش مقاومت میزبان در برابر پاتوژن‌ها، به‌عنوان گویاترین ارزیابی عملکرد سیستم ایمنی که پاسخ ایمنی کل را در سطح تمامیت موجود مورد سنجش قرار می‌دهد نیز بسیار کارآمد می‌باشد (Kollner و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به خسارات زیست محیطی و اقتصادی که در ارتباط با بروز بیماری‌های عفونی در آبزیان وجود دارد و لزوم توجه به شرایط محیط‌زیست ماهی در کنار دو عامل موثر دیگر در بروز بیماری (پاتوژن و میزبان)، در این آزمایش اثرات آفت‌کش ارگانوفسفره کلرپیریفوس به‌عنوان یک آلاینده شیمیایی آب‌های سطحی بر عملکرد ایمنی غیراختصاصی و چالش باکتریایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌عنوان یکی از ماهیان پرتولید در صنعت آبزی‌پروری (Hebb و همکاران، ۲۰۰۳) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری: کلیه مراحل پرورش و تغذیه ماهیان در کارگاه بهداشت و بیماری آبزیان واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انجام شد. بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۴±۴۲ گرم از روستای برغان واقع در استان البرز تهیه گردید و پس از انتقال به کارگاه، به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به‌مدت دو هفته نگه‌داری شدند، که در طی این مدت با غذای تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان مرحله پیش‌پرواری FFT۲ (ساخت شرکت غذای آبزیان فرادانه، شهرکرد، ایران؛ حدود ۴۳ درصد پروتئین خام، ۱۴ درصد چربی خام، فیبر خام حداکثر ۴ درصد، خاکستر حداکثر ۱۱ درصد، رطوبت حداکثر ۱۱ درصد، فسفر حداقل ۱ درصد) طی دو نوبت در روز راس ساعت ۷:۰۰ و ۱۹:۰۰ به میزان ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگارسازی، ماهیان جهت شروع آزمایش به‌طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاسی توزیع شدند (هر تانک ۱۵ قطعه ماهی) و تحت تاثیر تیمارهای گوناگون قرار گرفتند.

طرح آزمایش: کلرپیریفوس مورد استفاده به‌صورت مایع امولسیون شونده با خلوص ۴۰/۸٪ ساخت شرکت اکسیر کشاورزی (Agroxir) تهیه گردید. جهت شروع آزمایش تعداد ۱۸۰ ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با متوسط وزن ۴۲ گرم بین ۱۲ مخزن ۲۰۰ لیتری در قالب ۴ تیمار با ۳ تکرار تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت از گروه شاهد (۰ میکروگرم بر لیتر کلرپیریفوس)، گروه ۱ (۲/۵ میکروگرم بر لیتر کلرپیریفوس)، گروه ۲ (۵ میکروگرم بر لیتر کلرپیریفوس) و گروه ۳ (۱۰ میکروگرم بر لیتر کلرپیریفوس) بودند. غلظت‌های مورد آزمایش از کلرپیریفوس طوری انتخاب شدند که در طی مدت ۱۰ روز (طول مدت زمان قرارگیری ماهیان در معرض کلرپیریفوس) برای قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت‌کشنده باشند. براساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (۲۰۱۵) متوسط دوز کشنده کلرپیریفوس برای قزل آلای رنگین‌کمان در مدت ۹۶ ساعت ۲۴ میکروگرم بر لیتر عنوان گردیده است. در طی مدت آزمایش روزانه ۲۰٪ درصد از حجم آب مخازن، با محلول ذخیره ساخته شده از قبل که غلظت کلرپیریفوس در آب آن با تیمار آزمایشی متناظر برابر بود تعویض گردید. از لحاظ دوره کارنس، آفت‌کش مورد استفاده حدود ۱۰ روز پایایی دارد که با دوره آزمایش برابر است. به‌لحاظ اثرات شرایط فیزیکوشیمیایی آب نیز، در محدوده‌ای نبودند که باعث خنثی‌سازی اثر سم شوند.

روش‌های سنجش

نمونه‌گیری از خون: پس از اتمام دوره ۱۰ روزه آزمایش تعداد ۵ ماهی از هر مخزن آزمایش در محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خونگیری از ساقه دمی توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری و آغشته به‌هپارین انجام شد. قسمتی از نمونه‌های استحصال شده به میکروتیوب‌های هپارینه جهت سنجش تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون انتقال داده شد و مابقی پس از ۶ ساعت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس لایه فوقانی (سرم) توسط سمپلر از روی نمونه‌ها برداشته شد.

سنجش شاخص‌های خون‌شناسی: شمارش میزان گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید خون با استفاده از رقیق‌سازی خون و به‌وسیله لام هموسیتومتر انجام شد (Rehulka، ۲۰۰۰؛ Dorafshan و همکاران، ۲۰۰۸). به‌منظور تعیین هماتوکریت خون، نمونه‌های خون آغشته به هپارین به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفتند تا جداسازی سرم و هماتوکریت صورت پذیرد. سپس هماتوکریت به‌صورت درصدی با خط‌کش هماتوکریت محاسبه گردید (جلالی و خواجه، ۱۳۸۳). اندازه‌گیری هموگلوبین به‌روش استاندارد سیانومت هموگلوبین انجام گرفت (Feldman و همکاران،

۲۰۰۰). جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ابتدا گسترش خونی روی لام تهیه گردید. پس از خشک شدن لام و تثبیت با متانول، لام با رنگ گیمسارنگ‌آمیزی گردید و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون در زیر میکروسکوپ انجام گرفت (Houston و همکاران، ۱۹۹۶).

سنجش شاخص‌های ایمنی: سنجش پروتئین کل با استفاده از کیت بیونیک Bionik ساخت کشور ایران به‌روش بیوره-رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Koller و Kaplan، ۱۹۸۴؛ Young، ۲۰۰۱). غلظت آلبومین پلاسمای خون نیز با استفاده از کیت آزمایشی ساخت شرکت پارس آزمون ایران با روش فتومتریک در طول موج ۵۴۶ نانومتر سنجش شد (Burits و Ashwood، ۱۹۹۹؛ Thomas، ۱۹۹۸). سنجش میزان گلوبولین پلاسما نیز با کسر آلبومین از پروتئین کل به‌دست آمد. سنجش ایمونوگلوبولین تام سرم با استفاده از روش شرح داده شده توسط Siwiski و Anderson (۱۹۹۳) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. گلوبولین‌ها به اجزای کوچک‌تری تقسیم می‌شوند که شامل آلفا ۱، آلفا ۲، بتا ۱، بتا ۲ و گاماگلوبولین می‌باشند و ایمونوگوبولین‌ها جز گاماگلوبولین‌ها می‌باشند. به‌طور خلاصه ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه سرم با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ مخلوط شد و سپس به‌مدت ۲ ساعت برای پایین آوردن ملکول ایمونوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبولین توسط سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتی‌گراد برداشت شد. مقدار پروتئین کل در محلول فوقانی اندازه‌گیری شد و ایمونوگلوبولین به‌صورت میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بیان گردید. سنجش لیزوزیم سرم نیز با استفاده از روش طیف‌سنجی در طول موج ۶۷۰ نانومتر انجام شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از بافر فسفات سدیم به‌عنوان بلانک روی صفر تنظیم شد. سپس ۵۷/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (۰/۳۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH ۶/۲) با ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به‌روش طیف‌سنجی قرائت شد (Ellis و همکاران، ۱۹۹۰). فعالیت کمپلمان سرم به شیوه همولیتیک با استفاده از گلبول قرمز گوسفندی اندازه‌گیری شد (Yano و همکاران، ۱۹۹۲).

چالش بیماری: *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان پاتوژن باکتریایی معمول در ماهیان آب‌شیرین جهت آزمون چالش بیماری مورد استفاده قرار گرفت. در پایان دوره ۱۰ روزه آزمایش و انجام خونگیری تعداد ۳۰ ماهی از هر گروه آزمایشی به‌وسیله تزریق درون صفاقی دوز کشنده *Aeromonas hydrophila* (10^7 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) که قبلاً توسط LaPatra و همکاران (۲۰۱۰) تعیین شد تحت چالش باکتریایی قرار گرفتند و میزان مرگ و میر ماهیان در هر گروه آزمایشی تا ۱۴ روز پس از چالش شمارش شد و درصد بقا با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

نرخ بقا (٪) = ۱۰۰ × (تعداد اولیه ماهیان تزریق شده ÷ تعداد نهایی ماهیان زنده مانده)

کشت باکتری و آماده‌سازی آن جهت تزریق درون صفاقی: منبع اولیه باکتری *Aeromonas hydrophila* از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بیمار شده توسط این باکتری برداشت گردید. به‌منظور کشت باکتری، محیط کشت مایع (مدل TSB شرکت مرک آلمان) طبق دستورالعمل مصرف (۳۰ گرم از پودر برای یک لیتر آب مقطر) درون ارلن تهیه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید. پس از خروج ارلن حاوی محیط کشت از اتوکلاو و هم‌دما شدن آن با محیط، باکتری *Aeromonas hydrophila* به محیط کشت تلقیح شد و درون انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و مشاهده کدورت، محتویات ارلن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید، فاز مایع خارج شد و رسوب جامد باکتری توسط محلول بافر فسفات استریل طی سه مرحله شستشو و برداشت گردید (Amirkhani و Firuzbakhsh، ۲۰۱۵). غلظت باکتری در محلول نهایی توسط روش طیف‌سنجی اندازه‌گیری شد. تراکم باکتری تا رسیدن به غلظت 10^7 واحد کلنی بر میلی‌لیتر رقیق‌سازی شد و میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به‌صورت داخل صفاقی به ماهیان تزریق گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار برای هر گروه بیان شده است. تفاوت میان گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA پیوسته به‌دلیل تعداد کم جفت میانگین‌ها جهت مقایسه آن‌ها با یک‌دیگر با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ($P<0/05$) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های خون‌شناسی: پس از ۱۰ روز قرارگیری ماهیان در معرض دوزهای تحت‌کشنده کلرپیریفوس، شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱). تعداد گلبول‌های قرمز خون در ماهیان تحت تیمار با بالاترین دوز کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). سنجش تعداد گلبول‌های سفید خون نشان داد که قرارگیری ماهیان در معرض دوزهای متوسط و بالای کلرپیریفوس تعداد این سلول‌ها را در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ($P<0/05$).

هم‌چنین درصد هماتوکریت خون، با قرارگیری ماهیان در معرض دوزهای متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت(P<۰/۰۵).محتوای هموگلوبین خون در ماهیان تحت تیمار با کلرپیریفوس کاهش یافت و گروه در معرض بالاترین دوز کلرپیریفوس با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون نشان داد که درصد نوتروفیل خون در گروه‌های در معرض دوز متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (P<۰/۰۵). برعکس نوتروفیل‌ها، درصد لنفوسیت‌های خون در گروه‌های در معرض دوز متوسط و بالای کلرپیریفوس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). محاسبه درصد مونوسیت‌های خون هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین هیچ‌یک از گروه‌های آزمایش نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول ۱: اثرات مسمومیت تجربی با کلرپیریفوس بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص‌ها	شاهد	۱	۲	۳
گلبول قرمز خون ($\times 10^6$)	۱/۳۸ ± ۰/۰۲۵^{b}	۱/۲۸ ± ۰/۰۴۰^{ab}	۱/۲۷ ± ۰/۰۷۲^{ab}	۱/۲۴ ± ۰/۰۷۹^{a}
گلبول سفید خون ($\times 10^3$)	۴۳/۷۱ ± ۰/۸^{c}	۴۱/۰۸ ± ۱/۹^{bc}	۴۰/۵۶ ± ۱/۶۷^{b}	۳۷/۵۸ ± ۱/۲۲^{a}
هماتوکریت (٪)	۴۱/۵۱ ± ۱/۶۳^{c}	۳۹/۸۱ ± ۱/۳۵^{cb}	۳۶/۹۹ ± ۲/۲۵^{ab}	۳۵/۷۵ ± ۲/۳۹^{a}
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۱۱/۷۲ ± ۱/۶۰^{b}	۱۰/۰۶ ± ۰/۸۲^{ab}	۹/۸۰ ± ۱/۳۵^{ab}	۸/۴۳ ± ۰/۴۲^{a}
نوتروفیل (٪)	۱۸ ± ۲/۶۴^{a}	۲۱ ± ۳/۰۰^{a}	۲۹ ± ۴/۵۸^{b}	۳۴ ± ۲/۶۴^{b}
لنفوسیت (٪)	۷۶ ± ۴/۵۸^{b}	۷۵ ± ۳/۶۰^{b}	۶۴ ± ۴/۳۶^{a}	۶۰ ± ۱/۰۰^{a}
مونوسیت (٪)	۶/۳ ± ۲/۰۸^{a}	۴ ± ۱/۰۰^{a}	۷ ± ۱/۰۰^{a}	۶ ± ۲/۶۴^{a}

مقادیر به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (P<۰/۰۵).

شاخص‌های ایمنی خون: نتایج حاصل از سنجش شاخص‌های ایمنی خون (جدول ۲) نشان داد که قرارگیری ماهیان در معرض دوزهای تحت کشنده کلرپیریفوس موجب کاهش معنی‌دار ایمونوگلوبولین خون ماهیان مربوط به گروه ۳ (بالاترین دوز کلرپیریفوس) در مقایسه با گروه شاهد می‌شود (P<۰/۰۵). فعالیت لیزوزیم خون نیز با قرارگیری ماهیان در معرض کلرپیریفوس کاهش یافت، اما فقط اختلاف بین دو گروه شاهد و بالاترین دوز کلرپیریفوس معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). فعالیت کمپلمان خون در گروه‌های در معرض دوز متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). با قرارگیری ماهیان در معرض کلرپیریفوس میزان پروتئین کل خون در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت، اما فقط با گروه آزمایشی بالاترین دوز کلرپیریفوس اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). میزان آلبومین خون نیز در گروه‌های آزمایشی دوز متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). با قرارگیری ماهیان در معرض بالاترین دوز کلرپیریفوس، میزان گلوبولین خون ماهیان در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵).

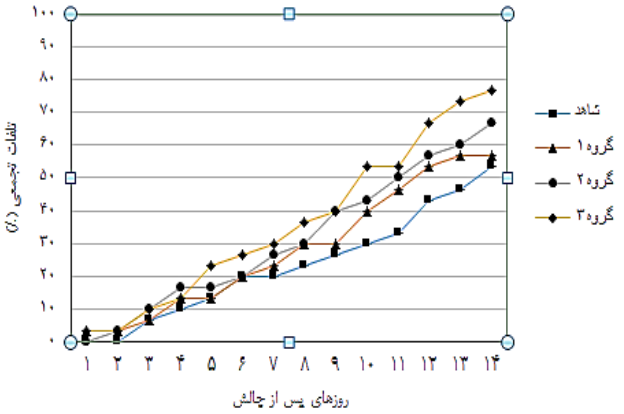
جدول ۲: اثرات مسمومیت تجربی با کلرپیریفوس بر شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص‌ها	شاهد	۱	۲	۳
ایمونوگلوبولین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	۲۶/۳ ± ۲/۰۰^{b}	۲۳/۳ ± ۳/۷۸^{ab}	۲۱ ± ۲/۶۴^{ab}	۱۹ ± ۳/۶۰^{a}
لیزوزیم (واحد بر میلی‌لیتر)	۱۲۱ ± ۹/۱۶^{b}	۱۱۴ ± ۶/۱۱^{ab}	۱۱۵ ± ۹/۸۴^{ab}	۱۰۱ ± ۷/۰۹^{a}
کمپلمان (واحد بر میلی‌لیتر)	۳۱۵ ± ۱۹/۲۲^{b}	۲۹۱ ± ۱۷/۵۸^{ab}	۲۶۱ ± ۲۶/۵۰^{a}	۲۶۸ ± ۱۷/۶۸^{a}
پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر)	۴/۸۹ ± ۰/۲۰^{b}	۴/۹۴ ± ۰/۱۵^{b}	۴/۷۶ ± ۰/۲۲^{b}	۳/۹۴ ± ۰/۲۸^{a}
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	۲/۱۳ ± ۰/۱^{b}	۲/۱۱ ± ۰/۱۹^{b}	۱/۸۱ ± ۰/۱۱^{a}	۱/۸۰ ± ۰/۱۵^{a}
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	۲/۷۶ ± ۰/۲۱^{b}	۲/۸۳ ± ۰/۱۱^{b}	۲/۹۵ ± ۰/۲۸^{b}	۲/۱۴ ± ۰/۴۳^{a}

مقادیر به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (P<۰/۰۵).

آزمون چالش باکتریایی: شکل ۱ نشان‌دهنده میانگین درصد تلفات تجمعی ماهیان مربوط به گروه‌های آزمایش در طی روزهای مختلف پس از چالش باکتریایی با *Aeromonas hydrophila* می‌باشد. کم‌ترین نرخ مرگ و میر تجمعی در گروه آزمایشی شاهد با میزان ۵/۷۷±۵۳/۳۳ درصد و بیش‌ترین نرخ مرگ و میر تجمعی در گروه آزمایشی ۳ (دوز بالای کلرپیریفوس) با میزان ۵/۷۷±۷۶/۶۶ درصد در روز ۱۴ پس از چالش ثبت گردید. به‌لحاظ آماری، گروه آزمایشی دوز بالای کلرپیریفوس با گروه شاهد و گروه ۱ در روز ۱۴ پس از

چالش با *Aeromonas hydrophila* اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵).



شکل ۱: نمودار میزان مرگ و میر تجمعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی ۱۴ روز پس از چالش با باکتری *Aeromonas hydrophila*. شاهد، گروه ۱ غلظت پایین کلرپیریفوس، گروه ۲ غلظت متوسط کلرپیریفوس، گروه ۳ غلظت بالای کلرپیریفوس.

بحث

در مطالعه حاضر، یک آزمون چالش باکتریایی توام با بررسی مجموعه‌ای از نشانگرهای وضعیت سلامت عمومی جهت ارزیابی اثرات زیان‌آور کلرپیریفوس بر عملکرد سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورداستفاده قرار گرفت. از آن‌جایی‌که شاخص‌های خون‌شناسی در پاسخ به تنش‌های شیمیایی آب دچار تغییر و تحول می‌شوند، در شناخت اثرات سموم بر وضعیت فیزیولوژی و سلامت عمومی ماهی بسیار کارآمدهستند(Galal و همکاران، ۲۰۱۸؛Modesto و Martinez، ۲۰۱۰). در طول دوران مواجه ماهیان با کلرپیریفوس هیچ‌گونه تلفاتی در بین ماهیان مشاهده نشد، که خود نشان‌دهنده انتخاب صحیح دوزهای تحت‌کشنده برای گروه‌های آزمایشی بود. نتایج به‌دست آمده از ارزیابی آماری شاخص‌های خون‌شناسی ماهیان، حاکی از کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز،مقدار هماتوکریت و محتوای هموگلوبین خون در گروه‌های در معرض کلرپیریفوس بود. کم‌ترین سطح از شاخص‌های مذکور در گروه آزمایشی بالاترین دوز کلرپیریفوس مشاهده گردید که ارتباط مستقیم بین کاهش شاخص‌های مذکور با افزایش دوز کلرپیریفوس را نشان می‌داد. نتایج مطالعات دیگری (Ahmadi و همکاران، ۲۰۱۴؛ Yonar و همکاران، ۲۰۱۴، Narra و همکاران، ۲۰۱۵) نیز کاهش شاخص‌های فوق، پیرو قرارگیری در معرض آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در ماهی را نشان می‌دهند. کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و محتوای هموگلوبین به طور غیرمستقیم نشان‌دهنده کاهش ایمنی غیراختصاصی ماهیان است و می‌تواند به‌دلیل اختلال در فرایند خون‌سازی، تنظیم اسمزی و یا افزایش سرعت تخریب گلبول‌های قرمز خون باشد (Abhijith و همکاران، ۲۰۱۲، Jenkins و همکاران، ۲۰۰۳) که همه این موارد بقا و سلامت ماهیان را به خطر می‌اندازند. سنجش تعداد گلبول‌های سفید خون نیز نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار این شاخص در نتیجه قرارگیری ماهیان در معرض کلرپیریفوس بود و با افزایش دوز کلرپیریفوس رابطه مستقیم نشان داد، به‌طوری‌که در بالاترین دوز کلرپیریفوس کم‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خون مشاهده گردید. با توجه به نقش مهم این سلول‌ها در سیستم ایمنی بدن، کاهش میزان آن‌ها موجب تضعیف و فعالیت نامناسب سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماریزامی‌شود(فوقانی و همکاران،۱۳۹۲).شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار درصد نوتروفیل‌های خون در دوزهای متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد بود. نوتروفیل‌ها با دارا بودن آنزیم میلوپراکسیداز نقش مهمی در فعالیت بیگانه‌خواری‌دارند و یکی از مهم‌ترین فرایندهای دفاعی خونی شناخته می‌شوند. بنابراین افزایش آن‌ها می‌تواند به‌علت افزایش فعالیت بیگانه خواری باشد و تحت شرایط آلودگی افزایش میزان آن‌ها دور از انتظار نیست (نوریان و همکاران، ۱۳۹۳). اما محاسبه درصد لنفوسیت‌های خون نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار آن در ماهیان تحت تیمار با کلرپیریفوس بود. لنفوسیت‌ها مرکزیت دفاع غیراختصاصی را تشکیل می‌دهند و در طی واکنش‌های التهابی در گردش خون، ارگان‌های لنفی و دیگر بافت‌ها دیده می‌شوند(جادی و همکاران، ۱۳۹۵). بنابراین کاهش آن‌ها نشان‌دهنده کاهش توان سیستم‌دفاع غیراختصاصی است. نتایجی مشابه از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون در آزمایش سعیدی‌فر و همکاران (۱۳۹۱) به‌دست آمد به‌طوری‌که قرارگیری قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض آفت‌کش دیازینون موجب کاهش معنی‌دار لنفوسیت‌ها و افزایش نوتروفیل‌های خون شد.

حضور پپتیدهای مختلف نظیر لیزوزیم، آنتی‌بادی، عوامل کمپلمان و عوامل دیگر لیتیک در سرم خون به‌عنوان خط دفاعی اولیه نقش‌مهمی در پیشگیری از بیماری‌های عفونی و تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی دارند (اکبری و یونسی، ۱۳۹۶). ایمونوگلوبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌های خون می‌باشند که نقش مهمی در مقابله با بیماری‌های عفونی باکتریایی ایفا می‌کنند و کاهش سطح فعالیت آن‌ها نشان‌دهنده ضعف در عملکرد سیستم ایمنی است (ربیعی، ۱۳۹۶). در آزمایش حاضر سطح ایمونوگلوبولین سرم خون در ماهیان تحت تیمار با کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت و گروه آزمایشی ۳ (بالاترین دوز کلرپیریفوس) با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد. مطالعه Yonar (۲۰۱۳) نیز

نتایجی هم‌سو با یافته‌های آزمایش حاضر در پی داشت، به‌طوری‌که سمیت تحت‌کشنده مالاتیون در کپور معمولی موجب کاهش معنی‌دار سطح ایمونوگلوبولین تام خون در مقایسه با گروه شاهد شد.

نتایج حاصل از سنجش سطوح خونی لیزوزیم نیز الگویی یکسان با آن‌چه که برای ایمونوگلوبولین مشاهده شد نشان داد و کاهش معنی‌دار سطح این آنزیم در بالاترین دوز کلرپیریفوس مشهود بود. مطالعه Ahmadi و همکاران (۲۰۱۴) نیز مهار این آنزیم در ماهیان قرار گرفته در معرض آفت‌کش دیازینون به‌صورت وابسته به دوز و مدت زمان قرارگیری در معرض آفت‌کش را تائید می‌نماید. لیزوزیم یک آنزیم با فعالیت ضدباکتریایی می‌باشد که موجب تخریب دیواره پپتیدوگلیکانی سلول‌های باکتریایی و نابودی آن‌ها می‌شود. افزایش سطوح این آنزیم با فعال‌سازی سیستم ایمنی همراه است (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم در سرم خون ماهیان قرار گرفته در معرض کلرپیریفوس نشان دهنده ناتوانی سیستم ایمنی در برابر عوامل باکتریایی است.

سیستم کمپلمان نقش اساسی در ایمنی غیراختصاصی، هم‌چنین فعال‌سازی لنفوسیت‌های B دارد (خارا و همکاران، ۱۳۹۲). شامل بیش از ۲۰ نوع پروتئین مختلف است که توسط طیف وسیعی از سلول‌ها ازجمله هپاتوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپیتلیال مجرای گوارشی تولید می‌شوند. این سیستم توان تشخیص سریع و اپسونیزه کردن باکتری جهت فاگوسیتوز از طریق فاگوسیت‌های اختصاصی یا از بین بردن مستقیم آن‌ها از طریق اختلال در غشاء آن‌ها دارد، بنابراین کاهش آن‌ها نشان‌دهنده آسیب‌پذیر بودن در برابر پاتوژن‌ها است (Ahmadi و همکاران، ۲۰۱۴).فعالیت کمپلمان سرم در گروه‌های در معرض دوز متوسط و بالای کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که حاکی از کاهش توان و ضعف عملکردی سیستم ایمنی جهت مقابله با عوامل پاتوژن در گروه‌های یاد شده می‌باشد.

از آن‌جایی که آلاینده‌ها با پروتئین‌های هسته‌ای سلول و اسید نوکلئیک‌ها واکنش می‌دهند و بر سنتز پروتئین اثر می‌گذارند، بنابراین ارزیابی سطح پروتئین‌های خون، جهت تشخیص اثرات زیان‌آور تنش‌های زیست‌محیطی و آلودگی آب‌ها بر ماهی، بسیار کارآمد می‌باشند (Harabawy و Ibrahim، ۲۰۱۴). پروتئین کل سرم شاخصی کارآمد در تشخیص عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد (عطایی‌مهر و همکاران، ۱۳۹۳). آلبومین و گلوبولین به‌عنوان دو جزء اصلی پروتئین‌های خون هستند که آلبومین‌ها در تنظیم فشار اسمزی و حمل و نقل برخی از مواد شیمیایی خارجی و متابولیت‌های درون‌زا نقش دارند، اما گلوبولین‌ها یک پروتئین بزرگ‌تر از آلبومین هستند و نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن و واکنش‌های ایمونولوژیک دارند (اکبری و یونسی، ۱۳۹۶). در آزمایش حاضر سطح پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین خون در ماهیان تحت تیمار با بالاترین دوز کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین طبق نتایج به‌دست آمده از سطح پروتئین تام و گلوبولین سرم‌خون، ارتباط مستقیم بین ضعف عملکردی سیستم ایمنی ماهیان با افزایش غلظت محیطی کلرپیریفوس مشهود می‌باشد.

آزمایش چالش مقاومت میزبان در برابر پاتوژن‌ها به‌عنوان گویاترین ارزیابی عملکرد سیستم ایمنی درنظر گرفته می‌شود، چرا که پاسخ ایمنی کل را در سطح تمامیت موجود مورد سنجش قرار می‌دهد (Kollner و همکاران، ۲۰۰۲). در آزمایش حاضر پس از اتمام دوره ۱۰ روزه قرارگیری ماهیان در معرض دوزهای مختلف کلرپیریفوس ماهیان به‌وسیله پاتوژن باکتریایی *Aeromonas hydrophila* مورد چالش قرار گرفتند که پس از طی دوره ۱۴ روزه چالش مشخص گردید میزان مرگ و میر تجمعی ماهیان در گروه‌های قرار گرفته در معرض کلرپیریفوس به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد و شاهد بیش‌ترین نرخ مرگ و میر تجمعی ماهیان در گروه آزمایشی بالاترین دوز کلرپیریفوس بودیم. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده تضعیف عملکرد سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان و افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی در اثر قرارگیری در معرض دوزهای تحت کشنده کلرپیریفوس می‌باشد.

ماهی در محیط زیست طبیعی خود به‌طور مداوم در معرض عوامل بیماری‌زا و فرصت‌طلب قرار می‌گیرد. تحت شرایط معمول از طریق سازوکارهای سیستم ایمنی ذاتی در مقابل عوامل مهاجم از خود محافظت می‌کند اما سرکوب سیستم ایمنی توسط عوامل شیمیایی می‌تواند موجب افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌ها و مرگ و میر شود که نتیجتاً پیامدهای جدی زیست محیطی و اقتصادی در پی دارد. با توجه به گزارشات متعدد از آلودگی منابع آبی توسط آفت‌کش‌های کشاورزی به‌ویژه سموم ارگانوفسفره، در این آزمایش اثرات کلرپیریفوس به‌عنوان یکی از سموم پرکاربرد کشاورزی بر عملکرد سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر پاتوژن باکتریایی *Aeromonas hydrophila* مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده گردید که قرارگیری در معرض سمیت حاد این آفت‌کش به‌طور وابسته به دوز می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت باکتریایی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طور بالقوه کاهش دهد. طبق نتایج به‌دست آمده از ارزیابی شاخص‌های خون‌شناسی و عوامل ایمنی غیراختصاصی، بالاترین دوز کلرپیریفوس موجب اثرات زیان‌بار جدی بر سلامت عمومی و ایمنی غیر اختصاصی ماهیان می‌شود و هم‌بستگی مثبت مشاهده شده بین پارامترهای فوق و میزان مرگ و میر ماهیان در چالش با *Aeromonas hydrophila* به‌خوبی اثرات سرکوب ایمنی توسط این

آفت‌کش را تائید می‌نماید. بنابراین به‌منظور پیشگیری از خسارات زیست محیطی و اقتصادی ناشی از بروز بیماری‌ها، توجه به کیفیت منابع آبی مورد استفاده در امر پرورش بسیار حائز اهمیت است.

منابع

۱. **آهنگرزاده، م.؛ قربانپور نجف‌آبادی، م.؛ پیغان، ر.؛ شریف روحانی، م. و سلطانی، م.، ۱۳۹۴.** نقش آئروموناس هیدروفیلا در سپتی‌سمی‌های باکتریایی کپور ماهیان پرورشی استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۵ تا ۱۶.

۲. **احمدی، ک.؛ میرواقفی، ع.؛ بنایی، م. و موسوی، م.، ۱۳۹۰.** مطالعه فاکتورهای خونی و آسیب شناسی بافتی ناشی از آئروموناس هیدروفیلا *(Aeromonas hydrophila)* در قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)*. شیلات (مجله منابع طبیعی). دوره ۶۴، شماره ۳، صفحات ۲۱۷ تا ۲۲۷.

۳. **اسدی، ط.؛ زنگویی، ن.؛ موسوی، س.م.؛ ذاکری، م. و بتوندی، ز.، ۱۳۹۴.** اثرات ضدمیکروبی عصاره الکلی زنجبیل(*Zingiber officinale*) بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان. پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی. دوره ۳، شماره ۲، صفحات ۵۹ تا ۶۷.

۴. **اکبری، پ. و یونسی، آ.، ۱۳۹۶.** تاثیر مکمل غذایی کیتوزان بر رشد، خون‌شناسی، بیوشیمی سرم خون و ایمنی ذاتی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*). مجله تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک. دوره ۳۰، شماره ۳، صفحات ۱۹۴ تا ۲۰۳.

۵. **اسفندیار، ف.؛ فیروزبخش، ف.؛ رحمانی، ح. و جانی‌خلیلی، خ.، ۱۳۹۵.** بررسی اثرات غلظت‌های تحت کشنده کلرپیریفوس بر فعالیت آنزیم‌های سرمی و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله شیلات. دوره ۶۹، شماره ۳، صفحات ۲۲۹ تا ۳۰۷.

۶. **پاک‌روان، س. و اکبرزاده، آرش.، ۱۳۹۶.** مروری بر مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان و چگونگی عملکرد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در مقابله با آن. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۱ تا ۹.

۷. **جادی، ع.؛ صفاهیه، ع.؛ موحدی‌نیا، ع.؛ دژندیان، سهراب.؛ حلاجیان، ع. و هاشمی، ر.س.، ۱۳۹۵.** مطالعه سمیت تحت‌کشنده آفت‌کش ارگانوفسفره دیازینون بر برخی پارامترهای خونی بچه‌ماهی سیم دریای خزر. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۷۱، شماره ۱، صفحات ۱۷ تا ۲۵.

۸. **خارا، ح.؛ محمدزاده، و.؛ قیاسی، م. و رهبر، م.، ۱۳۹۲.** بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی. مجله توسعه آبزی‌پروری. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۱۷ تا ۲۳.

۹. **خدادادی، م.؛ صمدی، م.؛ رحمانی، ع.؛ ملکی، ر.، الهرسانی، ع. و شهیدی، ر.، ۱۳۸۸.** بررسی غلظت باقی‌مانده سموم آفت‌کش ارگانو فسفره و کاربامات در منابع تامین آب آشامیدنی شهر همدان در سال ۱۳۸۶. نشریه سلامت و محیط زیست. دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۲۵۰ تا ۲۵۷.

۱۰. **راضی‌جلالی، م. و خواجه، غ.، ۱۳۸۳.** روش‌ها و مفاهیم خون‌شناسی برای تکنسین‌های دامپزشکی. انتشارات دانشگاه شهید چمران. ۱۹۰ صفحه.

۱۱. **رفیعیان، ش.؛ آموزگار، م.ع.؛ شوندی، م.؛ کاظمی، ح. و بامروت، م.، ۱۳۹۷.** ارزیابی تجزیه زیستی آفت‌کش‌های ارگانو فسفاته توسط باکتری‌های نمک‌دوست. مجله زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها. دوره ۷، شماره ۲۵، صفحات ۱ تا ۱۷.

۱۲. **سعیدی‌فر، م.؛ وهاب‌زاده‌رودسری، ح.؛ زمینی، ع. و کاظمی، ر.، ۱۳۹۱.** تاثیر آفت‌کش دیازینون بر رفتار و برخی شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله شیلات. دوره ۶، شماره ۱، صفحات۹۵ تا ۱۰۶.

۱۳. **عطایی‌مهر، ب.؛ باقری، پ.؛ امتیازجو، م. و یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س.، ۱۳۹۳.** بررسی اثر گیاه آلوئه‌ورا بر تغییرات میزان ایمونوگلوبولین‌های IgM، IgA و IgG پروتئین کل و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی جانوران). دوره ۲۷، شماره ۱، صفحات ۸۹ تا ۹۹.

۱۴. **غفاری‌فارسانی، ح.؛ هدایتی، س.ع.ا.؛ زارع‌ندیمی‌بین، ن.؛ عزیز پور، س. و شهبازی‌ناصرآباد، س.، ۱۳۹۵.** بررسی تاثیر غلظت‌های تحت‌کشنده سم مالاتیون بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)*. نشریه اقیانوس شناسی. دوره ۲۷، شماره ۷، صفحات ۱ تا ۹.

۱۵. **فرخی، ف.؛ جمیلی، ش.؛ شهیدی، م.؛ ماشینچیان، ع. و وثوقی، غ.، ۱۳۹۴.** بررسی تاثیر حشره‌کش مالاتیون بر بافت و آنزیم‌های کبدی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*). مجله علمی شیلات ایران. دوره۲۴، شماره ۴، صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۶.

۱۶. **فرمان‌زاده، د. و رضایی‌نژاد، ح.، ۱۳۹۶.** جذب آفت‌کش‌های اورگانو فسفره پاراتیون و کلرپیریفوس با نانولوله‌های بور نیترید دوپه شده با آهن، یک مطالعه نظری. مجله شیمی کاربردی. دوره ۱۲، شماره ۴۴، صفحات ۲۱۵ تا ۲۳۲.

۱۷. **فوقانی، ا.؛ شمسایی‌مهرجان، م. و حق بیان، س.، ۱۳۹۲.** اثر سم آفلاتوکسین بر پارامترهای خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchud mykiss*). مجله تحقیقات منابع طبیعی تجدید شونده. دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۴۵ تا ۵۶.

۱۸. **نقشبندی، ن. و عسکری‌حصنی، م.، ۱۳۹۶.** تاثیر سم ارگانو فسفره کلرپیریفوس بر تغییرات هورمون‌های تیروییدی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*). نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. دوره ۵، شماره ۲، صفحات ۱۹ تا ۳۴.

۱۹. **نوریان، م.؛ شجیعی، ه. و محمدنژادشموشکی، م.، ۱۳۹۳.** تاثیر سم دیازینون بر روی فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله زیست‌شناسی جانوری. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۹۹ تا ۱۰۶.

۲۰. **Abhijith, B.D.; Ramesh, M. and Poopal, R.K., 2012.** Sublethal toxicological evaluation of methyl parathion on some haematological and biochemical parameters in an Indian major carp *Catla catla*. Comparative Clinical Pathology. Vol. 21, pp: 55-61.

۲۱. **Agrahari, S.; Pandey, K.C. and Gopal, K., 2007.** Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 88, pp: 268-272.

۲۲. **Ahmadi, K.; Mirvaghefei, A.R.; Banaee, M. and Vosoghei, A.R., 2014.** Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Toxicology and Environmental Health Sciences. Vol. 6, pp: 1-7.

۲۳. **Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T., 2000.** Effects of dietary βcarotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Science. Vol. 66, pp: 1068-1075.

۲۴. **Amirkhani, N. and Firouzbakhsh, F., 2015.** Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Research. Vol. 46, pp: 716-724.

۲۵. **Banaee, M.; Sureda, A.; Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011.** Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide biochemistry and physiology. Vol. 99, pp: 1-6.

۲۶. **Benejam, L.; Benito, J. and García-Berthou, E., 2010.** Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. Water, Air, & Soil Pollution. Vol. 210, pp: 231-242.

۲۷. **Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., 1999.** Tietz textbook of clinical chemistry. pp: 676-716.

۲۸. **Deb, N. and Das, S., 2013.** Chlorpyrifos toxicity in fish: a review. Current World Environment. Vol. 8, pp: 77-84.

۲۹. **Dietrich, J.P.; Van, Gaest A.L.; Strickland, S.A. and Arkoosh, M.R., 2014.** The impact of temperature stress and pesticide exposure on mortality and disease susceptibility of endangered Pacific salmon. Chemosphere. Vol. 108, pp: 353-359.

۳۰. **Dogan, D. and Can, C., 2011.** Endocrine disruption and altered biochemical indices in male Oncorhynchus mykiss in response to dimethoate. Pesticide biochemistry and physiology. Vol. 99, pp: 157-161.

۳۱. **Dorafshan, S.; Kalbassi, M.R.; Pourkazemi, M.; Amiri, B.M. and Karimi, S.S., 2008.** Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 34, pp: 195-200.

۳۲. **Ellis, A.E.; Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Robertson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., 1990.** Lysozyme assay in techniques in fish immunology. Technique in Fish Immunology. USA, pp: 101-103.

۳۳. **Fečkaninová, A.; Koščová, J.; Mudroňová, D.; Popelka, P. and Toropilova, J., 2017.** The use of probiotic bacteria against Aeromonas infections in salmonid aquaculture. Aquaculture. Vol. 469, pp: 1-8.

۳۴. **Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000.** Schalm's Veterinary Hematology 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. pp: 1120-1124.

۳۵. **Galal, A.A.; Reda, R.M. and Mohamed, A.A.R., 2018.** Influences of Chlorella vulgaris dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of penoxsulam herbicide. Fish & shellfish immunology. Vol. 77, pp: 445-456.

۳۶. **Gobi, N.; Vaseeharan, B.; Chen, J.C.; Rekha, R.; Vijayakumar, S.; Anjugam, M. and Iswarya, A., 2018.** Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Fish & shellfish immunology. Vol. 74, pp: 501-508.

۳۷. **Hebb, C.D.; Castell, J.D.; Anderson, D.M. and Batt, J., 2003.** Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. Aquaculture. Vol. 221, pp: 439-449.

۳۸. **Houston, A.H.; Dobric, N. and Kahurananga, R., 1996.** The nature of hematological response in fish. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 15, pp: 339-347.

۳۹. **http://www.fao.org**.fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Chlorpyrifos_2015_08.pdf

۴۰. **Ibrahim, A.T.A. and Harabawy, A.S., 2014.** Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 106, pp: 33-39.

۴۱. **Koller, A. and Kaplan, L.A., 1984.** Total serum protein. In Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation. Mosby Company, St Louis, LO. pp: 1316-1319

۴۲. **Köllner, B.; Wasserrab, B.; Kotterba, G. and Fischer, U., 2002.** Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) how can environmental influences be detected? Toxicology letters. Vol. 131, pp: 83-95.

۴۳. **LaPatra, S.E.; Plant, K.P.; Alcorn, S.; Ostland, V. and Winton, J., 2010.** An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of fish diseases. Vol. 33, pp: 143-151.

۴۴. **Modesto, K.A. and Martinez, C.B., 2010.** Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere. Vol. 81, pp: 781-787.

۴۵. **Narra, M.R.; Rajender, K.; Reddy, R.R.; Rao, J.V. and Begum, G., 2015.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. Chemosphere. Vol. 132, pp: 172-178.

۴۶. **Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S. and Sugita, H., 2005.** The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 243, pp: 241-254.

۴۷. **Řehulka, J., 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 190, pp: 27-47.

۴۸. **Shelley, L.K.; Ross, P.S.; Miller, K.M.; Kaukinen, K.H. and Kennedy, C.J., 2012**. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on general health, disease susceptibility and gene expression. Aquatic toxicology. Vol. 124, pp: 217-226.

۴۹. **Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993.** Immuno stimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. US Fish Wildl Service-IFI. Vol. 1, pp: 1-17.

۵۰. **Thomas, L., 1998.** Clinical laboratory diagnostics 1ST ed Frankfurt TH. pp: 231-241.

۵۱. **Tripathi, G. and Shasmal, J., 2011.** Concentration related responses of chlorpyriphos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. Pesticide biochemistry and physiology. Vol. 99, pp: 215-220.

۵۲. **Yano, T., 1992.** Assays of hemolytic complement activity. *Techniques in fish immunology*, SOS Publication, Fair Haven, Nj. pp: 131-141.

۵۳. **Yonar, S.M., 2013.** Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 97, pp: 223-229.

۵۴. **Yonar, S.M.; Ural, M.Ş.; Silici, S. and Yonar, M.E., 2014.** Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 102, pp: 202-209.

۵۵. **Young, D.S., 2001.** Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC.

۵۶. **Zhang, Z.; Liu, Q.; Cai, J.; Yang, J.; Shen, Q. and Xu, S., 2017**. Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus carpio* L.) leads to oxidative stress and immune responses. Fish & shellfish immunology. Vol. 67, pp:604-611.