تأثیر سطوح مختلف آهن فریرون و پروبیوتیک بیوپلاس ب-۲ بر برخی پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

هاجر آذرین*، محمدرضا ایمان‌پور، مینا رجب‌پور، نوشین مهدی‌نژاد و علی جافر نوده

دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۸/ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۳۰

دانشکدهٔ شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
* مسئول مکاتبات : azarin2010@yahoo.com

چکیده. در تحقیق حاضر تأثیر ترکیب پروبیوتیک (بیوپلاس ب-۲) و آهن (فریرون) بر برخی از پارامترهای خونی ۲۷۰ بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) با میانگین وزنی ۰/۱±۰/۴ گرم و میانگین طولی ۳/۹±۰/۳ سانتی‌متر در ۹ تیمار با سه تکرار در مدت ۶۰ روز تحت بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداکثر تعداد گلبول‌های قرمز ۱/۵۵±۱/۶۵×۱۰^۶ عدد در میلی‌متر مکعب، میزان هموگلوبین ۷/۶۳±۰/۱۵ گرم در دسی‌لیتر خون، هماتوکریت ۲۴/۰۳±۰/۸۵ درصد، MCV ۱/۴۸ ± ۱/۴۵ فمتولیتر، MCH ۴۶/۲۹±۰/۲۵ پیکوگرم و لنفوسیت ۹۲±۲ درصد مربوط به تیمار ۵ بود. بیشترین میزان MCHC (۳۴/۶۵±۰/۶۷ گرم در دسی لیتر) در تیمار ۴ و بالاترین تعداد گلبول‌های سفید (۶/۶±۱۰۰ عدد در میلی‌متر مکعب) در تیمار ۸ مشاهده شد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد تیمار ۵ که حاوی بالاترین میزان آهن (۷ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا) و پروبیوتیک (CFC ۱/۶×۱۰^۹) در غذا بود بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و لنفوسیت را در این پژوهش نشان داد.

واژه های کلیدی. ماهی سفید، پارامترهای خونی، پروبیوتیک، بیوپلاس ب-۲

The effect of different levels of Fe $(So_4)_2$ $(7H_2O)$ and probiotics (BioPlus-2B) on some blood parameters of *Rutilus frisii kutum* fry

Hajar Azarin*, Mohammad Reza Imanpoor, Mina Rajabpour, Nooshin Mehdinejad and Ali Jafar Nodeh

Received 09.12.2013 / Accepted 20.06.2015

Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
*Correspondent author: azarin2010@yahoo.com

Abstract. In this study the effect of iron of Fe $(So_4)_2$ $(7H_2O)$ and probiotics BioPlus 2B on some blood parameters was investigated on 270 of *Rutilus frisii kutum* fry with total weight of 0.4±0.1 gr and total length of 3.9±0.3 cm in nine treatments and triplicates during 60 days. Results showed that the highest number of red blood cells (RBCs) ($1.65\times10^6\pm$ 1.55 per mm^3), hemoglobin concentration (7.36±0.15 g/dl), hematocrit concentration (24.03±0.85 %), MCV (1.45±1.48 Fl), MCH (46.29±0.25 pg) and lymphocyte (92±2) belong to treatment 5. The highest level of MCHC (34.65±0.67 g/dl) and the greatest level of white blood cells (6.6±100 per mm^3) were observed in treatments 4 and 8, respectively. The findings of this research showed that treatment 5 contained the highest amount of iron (7 mg/kg of feed) and probiotics (CFC 1.6×10^9) resulted in the highest amount of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH and lymphocytes in this study.

Keywords. *Rutilus frisii kutum*, blood factors, probiotic, BioPlus 2B

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

مقدمه

درحال حاضر هدف اصلی از صنعت آبزی‌پروری، افزایش رشد و بقا، کارایی غذا و مقاومت در برابر موجودات آبزی است که اثر مثبتی برکاهش هزینه‌های تولید دارد (Gatlin, 2002). غذا یکی از پرهزینه‌ترین بخش‌های آبزی‌پروری است و بهینه‌سازی آن می‌تواند نقش بسیار مهمی در کاهش هزینه‌های تولید به همراه داشته باشد (اکرمی و همکاران، ۱۳۸۹). در سال‌های اخیر به منظور جلوگیری از اثرات نامطلوب در پرورش ماهی و همچنین برای بهبود وضعیت سلامت و کارایی مصرف غذا از افزودنی‌های غذایی زیادی ازجمله پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Bageri *et al.*, 2008). به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها در جیره‌ها می‌تواند از طریق کاهش غذای لازم برای رشد ماهیان کارایی تغذیه را افزایش دهد و کاهش هزینه‌های پرورش آبزیان را در پی داشته باشد (Yanbo & Zirong, 2006). چنین نتایجی در کاهش ضریب تبدیل غذایی و نیز غذای نسبی که در لاروهای ماهیان قزل‌آلا در تیمارهای تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها مشاهده شده است (جعفریان و همکاران، ۱۳۸۸). مطالعه‌های متعدد صورت‌گرفته نشان می‌دهد که باکتری‌های پروبیوتیک با سنتز مواد مغذی ضروری (ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب ضروری) و آنزیم‌ها (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) کارایی تغذیه را افزایش می‌دهند (Ghosh *et al.*, 2008). رودهٔ لاروهای آبزیان به طور سریع توسط باکتری‌های محیطی در خلال روزهای اول زندگی بعد از تفریخ شدن، کلنی می‌شوند. اعضای این اجتماعات اولیه باکتریایی که در روده آبزی کلنی می‌شوند، باید در رقابت با دیگر باکتری‌ها به برتری رقابتی بالایی دست یابند. بنابراین معرفی گونه‌ای باکتری مفید یا پروبیوتیک باید بلافاصله با شروع تغذیه فعال ازطریق مکمل سازی با غذا صورت گیرد (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Yanbo & Zirong, 2006). پروبیوتیک بیوپلاس حاوی دو گونه باکتری از جنس باسیلوس به اسامی *Bacillus subtilis* و *Bacillus lecheniformis* است که به‌منزلهٔ افزودنی در جیره‌های غذایی طیور و آبزیان در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. این باکتری ها قادر به شکستن پروتئین‌ها وکربوهیدرات‌ها (Farzanfar, 2006) و همچنین قادر به تولید برخی ویتامین‌ها از جمله ویتامین‌های گروه B مثل بیوتین و B12 هستند که می‌توانند فاکتور دیگری برای متابولیسم بهتر مواد غذایی در این تیمارها باشند (Arianto & Austin, 2002). همچنین گونه‌های باسیلوس قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، آمینواسیدها و آنزیم‌ها هستند (Schiffrin *et al.*, 1997). از این‌رو پروبیوتیک‌های باسیلوس می‌توانند اثرات تغذیه‌ای مثبتی در ماهی‌ها داشته باشند (Bagheri *et al.*, 2008). ازآنجا که جنس باسیلوس به‌عنوان پاتوژن ارگانیسم‌های آبزی تا به حال گزارش نشده است (Moriarty, 1998)، کاربرد آن به طور وسیعی در صنعت آبزی‌پروری پذیرفته شده است (Gullian *et al.*, 2004). گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر مثبت استفاده از افزودنی غذایی بیوپلاس ب-۲ بر رشد و بازماندگی خوک، ماکیان (Kurti, 2000) و ماهی، ازجمله قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود دارد (Farzanfar *et al.,* 2007). در اثر افزودن ۰/۱ درصد پروبیوتیک بیوپلاس به جیره‌های غذایی، کاهش معنی‌داری در کلسترول خون در جوجه‌های گوشتی نر در سن ۳۵ تا ۴۵ روزگی نسبت به گروه شاهد صورت گرفته است (Karimi & Rahimi, 2004). اکثر میکروارگانیسم‌ها برای رشد به آهن نیاز دارند (Reid *et al.*, 1993) و باکتری‌های بیماری‌زای موفق آنهایی هستند که در رقابت برای جذب آهن مخصوصاً در شرایط کمبود آهن در بافت‌ها و مایعات بدن میزبان، بتوانند بر رقبای خود غالب شوند (Farzanfar, 2006). در رقابت برای جذب آهن گروهی از باکتری‌ها توانایی تولید ترکیباتی مانند سایدروفورها را دارند که این ترکیبات به جذب آهن کمک می‌کنند. پس احتمالاً باکتری‌های بی ضرری که بتوانند سایدروفور تولید کنند می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک علیه عوامل بیماریزایی که نیاز به آهن دارند، به کار برده شوند (Serrano, 2005). سایدروفورها می‌توانند آهن رسوب یافته را حل و آن را برای رشد میکروب‌ها قابل دسترس نمایند. عوامل بیماری‌زای باکتریایی که موجب بروز بیماری می‌شوند، قادرند در رقابت برای جذب آهن موجود در بافت‌ها و مایعات بدن میزبان، به‌خوبی ظاهر شوند و نسبت به دیگر باکتری‌ها رشد بیشتری نشان دهند (Wooldridge *et al.*, 1993). این نتایج نشان‌دهندهٔ اهمیت و نقش ترکیبات

آهن‌دار در رشد باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها در بدن میزبان است (Serrano, 2005). مفهوم غذاهای هدفمند در صنعت آبزی‌پروری جدید است اما مدل جدیدی برای توسعه جیره‌های غذایی پدیدار آمده‌است که رضایت‌مندی بیشتری را بر اساس مواد غذایی مورد نیاز در موجودات پرورشی خواهد داشت. به همین دلیل، در تحقیق حاضر اثر پروبیوتیک بیوپلاس ب-۲ و آهن ازطریق اضافه شدن به غذا، بر برخی پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید تحت بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

این آزمایش در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این تحقیق از ۲۷ آکواریوم به ابعاد ۶۰ × ۴۰ × ۳۰ سانتی‌متر استفاده شد. نمونه‌های مورد استفاده ماهی سفید با میانگین وزن اولیه ۰/۴±۰/۱ گرم و میانگین طولی ۳/۹±۰/۳ سانتی‌متر و به تعداد ۲۷۰ عدد بود که در هر آکواریوم ۱۰ عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب و رها شد و به‌مدت ۶۰ روز تحت بررسی قرار گرفت. تحقیق مورد بررسی شامل ۹ تیمار بود و هر تیمار با سه تکرار انجام شد. فراوردهٔ میکروبی به‌کاررفته، یک نوع پروبیوتیک شامل دو گونه باکتری *Bacillus licheniformis* و *Bacillus subtilis* (به تعداد CFU $۱/۶\times۱۰^{۹}$باکتری در هر گرم از پودر این فراورده و با نسبت ۱:۱ از هر دو سویه باکتری مذکور) و آهن به‌کاررفته نیز از آهن فریرون، هر یک میلی‌لیتر محتوی: ۱۲۵ میلی‌گرم فروس سولفات هپتاهیدرات $Fe\ (So_4)_2\ (7H_2O)$ بود. برای آماده‌سازی جیره های ۱ و ۲، مقدار پروبیوتیک لازم برای هر تیمار با ترازو وزن شد. مطابق روش مورد استفاده توسط Chang و Liu به پروبیوتیک آب مقطر اضافه شد، سپس روی غذا اسپری گردید (Chang & Liu, 2002). جهت آماده‌سازی جیره‌های ۳ و ۴ به آهن مصرفی آب مقطر اضافه و روی غذا اسپری شد. در خصوص تیمارهای ۵، ۶، ۷ و ۸ ابتدا پروبیوتیک و سپس آهن روی غذا اسپری شد. به ماهیان تیمار شاهد ۹ نیز غذای اسپری-شده با آب مقطر خورانده شد. کلیهٔ غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار گرفتند تا آب مخلوط‌شده با غذا تبخیر شود. جیره‌های آزمایشی جهت تغذیهٔ بچه‌ماهیان در جدول شماره ۱ آمده است. میزان کل غذای موردنیاز بچه‌ماهیان برای کلیه تیمارها بر اساس نتایج زیست‌سنجی (هر دوهفته یکبار) در هر-یک از آکواریوم‌ها قرار داده‌شد. غذادهی روزانه حدود ۵ درصد وزن توده زنده در کل دوره پرورش بود و ماهیان سه وعده در روز غذادهی شدند. میانگین پارامترهای کیفی آب طی دورهٔ آزمایش عبارت بود از: درجه حرارت: ۱±۲۳/۱ درجه سانتی‌گراد، pH: ۸/۵ ±۰/۴، اکسیژن محلول: ۷/۹ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل: ۳۰۰±۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم، قلیائیت: ۰±۲۷۵ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم و میزان فسفات: ۰/۰۹ ±۰/۳۵.

جدول ۱- جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در تغذیهٔ بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در تیمارهای مختلف.

Table 1. Experimental diets used in the feeding of Kutum fry (*Rutilus frisii kutum*) in different treatments.

تیمار	جیره
۱	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۶\times۱۰^{۹}$
۲	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۲\times۱۰^{۹}$
۳	جیرهٔ غذایی به همراه محلول آهن به مقدار ۷ میلی گرم در کیلوگرم غذا
٤	جیرهٔ غذایی به همراه محلول آهن به مقدار ۵ میلی گرم در کیلوگرم غذا
٥	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۶\times۱۰^{۹}$ و محلول آهن به مقدار ۷ میلی گرم در کیلوگرم غذا
٦	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۶\times۱۰^{۹}$ و محلول آهن به مقدار ۵ میلی گرم در کیلوگرم غذا
۷	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۲\times۱۰^{۹}$ و محلول آهن به مقدار ۷ میلی گرم در کیلوگرم غذا
۸	جیرهٔ غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار CFU/gr $۱/۲\times۱۰^{۹}$ و محلول آهن به مقدار ۵ میلی گرم در کیلوگرم غذا
۹	جیرهٔ غذایی شاهد بدون مکمل‌سازی با پروبیوتیک و آهن

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

در پایان دورهٔ ۶۰ روزه، پس از گذشت ۲۴ ساعت از قطع غذادهی، از ماهی‌های هر تکرار (۱۰ ماهی در هر تکرار) پس‌از قطع ساقه دمی خون‌گیری به عمل آمد و نمونه‌های خون در داخل ویال‌های یک سی‌سی که حاوی ماده ضد انعقاد هپارین بود ریخته شد و درکوتاه‌ترین زمان (زیر ۳ ساعت و در دمای زیر ۴ درجه) جهت بررسی‌های زیر به آزمایشگاه منتقل شدند.

اندازه‌گیری هموگلوبین با واحد گرم در دسی‌لیتر با روش سیانومت هموگلوبین و در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با محلول درابکین انجام شد و با منحنی استاندارد تعیین هموگلوبین مقایسه شد (Houston, 1990).

اندازه‌گیری هماتوکریت با لوله‌های میکروهماتوکریت و توسط میکروسانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) و خط‌کش معمولی انجام گرفت.

شمارش گلبول‌های قرمز به کمک ملانژورهای گلبول قرمز ومحلول رقیق‌کنندهٔ هایم و به‌وسیله لام هماسیتومتر صورت گرفت. شمارش گلبول‌های سفید با استفاده از ملانژورهای گلبول سفید و محلول رقیق‌شدهٔ ریس که شامل ۰/۱ گرم رنگ بریلیانت کریزیل بلو، ۳/۸ گرم سیترات سدیم، ۰/۲ میلی‌متر مکعب فرمالین ۴۰ درصد و ۱۰۰ میلی‌مترمکعب آب مقطر بود انجام شد.

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیهٔ گسترش، به‌وسیلهٔ رنگ گیمسا عمل رنگ‌آمیزی صورت گرفت و در هر گسترش ۱۰۰ عدد گلبول سفید به صورت تصادفی شمارش شدند و درصد فراوانی آن‌ها محاسبه شد (Blaxhall, 1972).

جهت تعیین اندیس‌های خونی از فرمول‌های زیر استفاده گردید (Benfey & Sutterlin, 1984; Cogswll *et al*., 2002).

(میانگین حجم گلبولی)

$$MCV(fl) = \frac{\text{هماتوکریت} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول قرمز بر حسب میلیون عدد در میلی متر مکعب}}$$

(میانگین هموگلوبین گلبولی)

$$MCH(pg) = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول قرمز بر حسب میکرون عدد در میلی متر مکعب}}$$

(میانگین غلظت هموگلوبین گلبولی)

$$MCHC(\%) = \frac{\text{غلظت هموگلوبین} \times ۱۰}{\text{هماتوکریت}}$$

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم جدول‌ها به‌ترتیب بااستفاده از نرم‌افزارهای کامپیوتری SPSS و Excel انجام شد. طرح کلی این تحقیق درقالب طرح کاملاً تصادفی بود و پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها، کلیه داده‌ها به‌وسیله تحلیل واریانس یک-طرفه و آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلافات بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $p<۰/۰۵$ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

مقایسهٔ میانگین‌های پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در تیمارهای مختلف در جدول شماره ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و درصد لنفوسیت در تیمار ۵ که حاوی بالاترین سطح پروبیوتیک و آهن بود بیشترین میزان را داشت. تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۸ بالاترین میزان را نشان داد و بقیه تیمارها در-خصوص تعداد گلبول‌های سفید با هم دارای اختلاف معنی‌دار نبودند.

تیمار ۳ و تیمار شاهد کمترین تعداد گلبول‌های قرمز را به خود اختصاص دادند. ازنظر تعداد گلبول‌های قرمز بین تیمار ۵ با تیمار ۱، ۳، ۴، ۷ و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). ازنظر میزان هموگلوبین، هماتوکریت و میزان MCV تیمار ۵ با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). تیمار ۵ با تیمار ۶ ازنظر میزان MCH دارای اختلاف معنی‌دار نبود و با دیگر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان MCHC در تیمار ۵ و بالاترین میزان MCHC در تیمار ۴ مشاهده شد و تیمار ۴ با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

جدول ۲- مقایسهٔ میانگین‌های پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در تیمارهای مختلف تغذیه‌شده با آهن فریرون و پروبیوتیک بیوپلاس ب-۲.

Table 2. Comparison of the blood parameters of Kutum fry (*Rutilus frisii kutum*) in different treatments supplemented with Fe $(So_4)_2$ $(7H_2O)$ and probiotic (BioPlus-2B).

پارامترها	تیمار شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ٤	تیمار ٥	تیمار ٦	تیمار ۷	تیمار ۸
تعداد گلبول‌های سفید (میلی‌متر مکعب)	۶/۳ ±۱/۷ ab	۶/۲± ۱ b	۶/۲ ±۲ b	۶/۲۳ ±۵/۷ b	۶/۳۳ ±۱/۵ ab	۶/۱۳ ±۶/۱ b	۶/۲ ±۲ b	۶/۰۱ ±۲/۸ b	۶/±۱ a
تعداد گلبول‌های قرمز (میلی‌متر مکعب)	۱/۵۳ ±۱/۵ C	۱/۵۷±۱/۴ b	۱/۶۳±۱/۲ ab	۱/۵۳±۱/۹ c	۱/۵۷±۱/۹ bc	۱/۶۵±۱/۱ a	۱/۵۹±۱/۸ abc	۱/۵۶±۱/۸ bc	۱/۵۸ ±۱/۸ abc
همو گلوبین (گرم در دسی لیتر)	۶/۳±۰/۰۵ c	۷/۰۳ ±۰/۱ bc	۷/۲۰ ±۰/۱ bc	۶/۸۳ ±۰/۳ c	۷/۰۳±۰/۰۵ bc	۷/۶۳ ±۰/۱ a	۷/۲۳±۰/۳ b	۶/۸۳ ±۰/۰۵ c	۷/۱ ±۰/۲ bc
هماتوکریت (درصد)	۲۰/۴۲±۰/۳ bc	۲۰/۸ ±۰/۸ bc	۲۱/۵۰ ±۰/۳ bc	۲۰/۲ ±۱/۱ c	۲۰/۳۳ ±۰/۲ c	۲۴/۰۳ ±۰/۸ a	۲۲ ±۱/۷ b	۲۰/۶۰ ±۰/۲ bc	۲۱/۷۰ ±۰/۹ bc
MCV (فمتولیتر)	۱/۳۲±۱/۶ bcd	۱/۳۲ ±۳/۸ cd	۱/۳۱ ±۲/۳ cd	۱/۳۱ ±۲/۶ cd	۱/۲۹±۲/۲ d	۱/۴۵±۱/۴ a	۱/۳۸ ±۶/۴ b	۱/۳۱±۰/۵ cd	۱/۳۲±۰/۸ bc
MCH (پیکوگرم)	۴۴/۵۸ ±۰/۱ bcd	۴۴/۷۵ ±۰/۵ bcd	۴۴/۱۴ ±۰/۷ cd	۴۴/±۰/۵ bcd	۴۴/۹۰±۰/۰۹ bc	۴۶/۲۹±۰/۲ a	۴۵/۵۵±۰/۷ ab	۴۳/۸۸ ±۰/۵ d	۴۴/۷۸±۰/۳ bcd
MCHC (درصد)	۳۳/۵۵±۰/۲ bc	۳۳/۹۱±۰/۵ ab	۳۳/± bc	۳۳/۵۱ ±۰/۵ bc	۳۴/۶۵±۰/۶ a	۳۱/۸۳±۰/۵ d	۳۳/۰۳ ±۰/۹ bc	۳۳/۲۵±۰/۵۶ bc	۳۲/۷۳±۰/۴ cd
نوتروفیل (درصد)	۱۰ ±۰ a	۷± ۰ c	۷ ±۱ c	۸ ±۰ bc	۸ ±۰ bc	۸ ±۲ bc	۸/۳۳ ±۰/۵ bc	۸ ±۰ bc	۹/۳۳ ±۰/۵ ab
لنفوسیت (درصد)	۹۰ ±۰ b	۹۳ ±۱/۵ a	۹۲ ±۱/۵۲ a	۹۱/۳۳ ±۰/۵ ab	۹۲ ±۰ a	۹۲ ±۲ a	۹۱/۳۳ ±۰/۵ ab	۹۲ ±۰ a	۹۰ ±۰ b

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

بالاترین درصد نوتروفیل در تیمار شاهد مشاهده شد و تیمار شاهد به جز تیمار ۸ با سایر تیمارها از نظر درصد نوتروفیل اختلاف معنی‌دار داشت. همچنین تیمار شاهد ازنظر درصد لنفوسیت با تیمار ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷ دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها پارامترهای ایمنوهماتولوژیکی مختلفی را در ماهیان استخوانی تنظیم می‌کنند. در این تحقیق تیمار ۸ بالاترین تعداد گلبول‌های سفید را به خود اختصاص داد. درصد لنفوسیت در تیمارهای ۱ و ۲ به‌جز تیمار ۸ و تیمار شاهد با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت و از تیمار شاهد بالاتر بود. پروبیوتیک‌ها با سلول‌های ایمنی مثل سلول‌های فاگوسیت تک-سلولی (مونوسیت‌ها، ماکروفاژها) و لوکوسیت‌های چندهسته‌ای (نوتروفیل) برای افزایش پاسخ‌های ایمنی ذاتی تداخل کنند. همانند مهره‌داران رده‌های بالاتر بعضی پروبیوتیک‌ها تعداد اریتروسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها را در ماهیان مختلف افزایش می‌دهند. همچنین پروبیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی و شرایط بدن به طور فعال لنفوسیت‌های B را در ماهی تحریک می‌کنند (Nayak, 2010). درخصوص درصد نوتروفیل تیمار ۱ و ۲ که حاوی پروبیوتیک بودند، کاهش درصد نوتروفیل را نسبت به تیمارهای دیگر نشان دادند. Sharifuzzaman و Austin بالاترین ایمنی سلولی و خونی را طی ۲ هفته تغذیه با مکمل پروبیوتیک ثبت کرده و بیان کردند استفاده بیشتر از مکمل‌ها به کاهش در هفته سوم و چهارم تغذیه منجر شد (Sharifuzzaman & Austin, 2009).

در بررسی حاضر میزان لنفوسیت در تیمارهای حاوی پروبیوتیک دارای بالاترین میزان بود. برخی محققان معتقدند تغذیهٔ طولانی مدت با پروبیوتیک‌ها لازم نیست (Choi & Yoon, 2008). برخی نیز معتقدند غذادهی در زمان کوتاه باعث کاهش شدید در پاسخ ایمنی ماهی می‌شود (Panigrahi *et al.*, 2005). این کاهش ممکن است به دلیل شکست سویه‌های پروبیوتیک برای استقرار و تکثیر در روده میزبان باشد. تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH در تیمار ۵ که دارای بالاترین سطح پروبیوتیک و آهن در این بررسی بود، بیشترین میزان را نشان داد. تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار ۳ که فقط دارای پروبیوتیک بود و همچنین در تیمار شاهد نسبت به دیگر تیمارها دارای کمترین میزان بود. افزایش سطوح ایمونوگلوبین به‌واسطهٔ مکمل پروبیوتیک در بسیاری حیوانات از جمله ماهی گزارش شده است. Song و همکاران سطوح بالای ایمونوگلوبین را در موکوس پوست *Michthys miiuy* توسط کلستریدیوم بوتریوم (*Clostridium butyrium*) گزارش کردند (Song *et al.,* 2006). باکتری‌های مختلف اسیدلاکتیک (LAB)، گروهی از باکتری‌های پایدار و ناپایدار، سطوح ایمونوگلوبین را در ماهی بالا می‌برند (Panigrahi *et al.*, 2005) و حتی یک هفته استفاده از پروبیوتیک‌ها مثل لاکتوباسیلوس‌ها به طور قابل توجهی سطوح ایمونوگلوبین را در قزل‌آلای رنگین کمان افزایش می‌دهد (Nayak, 2010).

میزان هموگلوبین، هماتوکریت، MCV و MCH بین تیمار ۵ و تیمارهای ۱ و ۲ که تنها با پروبیوتیک مکمل شده بودند، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (p<۰/۰۵). Firdaus و همکاران نشان دادند که فقدان آهن در رژیم غذایی یک نوع گربه‌ماهی (*Heteropneustes fossilis*) باعث کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Firdaus *et al.,* 1994). وجود آهن اضافی در جیرهٔ غذایی بر میزان تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV و MCH تأثیر می‌گذارد که درنتیجه تیمار ۵ نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ دارای مقادیر بالاتری از این پارامترها می باشد. در آزمایش Mohan و همکاران غلظت هموگلوبین خون جوجه‌های گوشتی با افزایش سطوح مختلف پروبیوتیک کاهش یافت که علت آن به خاطر رقابت پروبیوتیک با بدن برای تحصیل اسیدفولیک غذا ذکر شده است، به این صورت که اسیدفولیک غذا، کمتر در دسترس بدن قرار می‌گیرد و به ایجاد علائم کم‌خونی منجر می شود (Mohan *et al.,* 2009). در تحقیق حاضر نیز احتمالاً *B.subtilis* و *B. lisheniformis* برای جذب اسیدفولیک دارای رقابت فشرده ای بوده و در نتیجه سطح هموگلوبین در تیمارهایی که فقط پروبیوتیک به غذایشان اضافه شده بود، کاهش یافته است. در بررسی که توسط ناصری و همکاران صورت گرفته بود نشان داده شد که تعداد گلبول-

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت در ماهیانی که با جیرهٔ غذایی حاوی آهن و پروبیوتیک تغذیه شده بودند، مقادیر بالاتری نسبت به تیمارهایی داشت که دارای سطوح کمی پروبیوتیک و آهن بودند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (ناصری و همکاران، ۱۳۸۷). Reid و همکاران نشان دادند که استفاده از بیوپلاس ب-۲ در قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر بیماری *Yersinia ruckeri* اختلاف معنی‌داری در هماتوکریت تیمارهای پروبیوتیکی به وجود نمی‌آورد (Reid *et al.*, 2003). تأثیر پروبیوتیک به استقرار موفقیت‌آمیز پروبیوتیک‌ها در روده بستگی دارد. چندین عامل که بر استقرار و ثبات پروبیوتیک‌ها و عملکردهای بعدی آن‌ها تاثیر می‌گذارد شامل کیفیت آب، سختی، اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH، فشار اسمزی و اصطکاک مکانیکی است. علاوه بر این‌ها استرس با توجه به تراکم زیاد نیز می‌تواند عملکرد پروبیوتیک‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. Mehrim اثر پروبیوتیک‌هایی را روی *O.niloticus* در تراکم‌های مختلف از ۱۰ تا ۶۰ ماهی در متر مکعب بررسی کردند و بهترین رشد، پارامترهای هماتولوژیکی و کارایی اقتصادی پروبیوتیک‌ها در تراکم ۳۰ ماهی در متر مکعب به‌دست آمد (Mehrim, 2009). ازطرفی مطالعات مختلف در شرایط بدن و شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد پاسخ ایمنی ماهی در مقادیر مختلف پروبیوتیک تغییر می‌کند. مقدار پروبیوتیک‌ها معمولاً بر اساس توانایی آنها در افزایش رشد و حفاظت در میزبان تعیین می‌شود. بنابراین مقادیر مطلوب پروبیوتیک بسته به نوع میزبان و همچنین نوع پارامترهای ایمنی تغییر می‌کند (Nayak, 2010). با بررسی Panigrahi و همکاران ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با CFU/g feed ۱۰۱۱ پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* به مدت ۳۰ روز لیزوزیم سرم، فعالیت فاگوسیتوز لوکوسیت‌های رأس کلیه و همچنین فعالیت‌های تکمیلی بالایی نشان دادند، اما مقدار CFU/g feed 10^{9} در آن اثری نداشت (Panigrahi *et al.*, 2004). همچنین تحریک پاسخ‌های ایمنی خاص با توجه به بافت‌های مختلف و همچنین دوزهای مختلف تغییر می‌کند. براساس نتایج این تحقیق می‌توان گفت که بین تیمارهای آزمایشی، تیمار شامل سطح بالای پروبیوتیک (CFU/gr $1/6\times10^{9}$) و سطح بالای آهن (۷ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) یعنی تیمار ۵ بهترین تأثیر را بر پارامترهای خونی تحت بررسی در این تحقیق داشت و این تیمار جهت بررسی‌های بعدی پیشنهاد می‌شود. تفاوت‌های موجود در نتایجی را که محققان مختلف گزارش کرده‌اند احتمالاً بایستی به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای و خصوصیات فیزیولوژیک آبزی‌پرورشی مرتبط دانست.

تشکر و قدردانی

از مسئولان آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی گرگان و افرادی که در فراهم ساختن تجهیزات لازم جهت انجام این پژوهش همکاری کردند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع / References

اکرمی، ر.، قلیچی، ا و قرایی، ا. ۱۳۸۹. کاربرد پروبیوتیک‌ها در آبزی-پروری. – مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر ۴ : ۸۴-۷۷.

جعفریان، ح.، طاعتی کلی، م و نظرپور، ع. ۱۳۸۸. بررسی اثر باسیل های پروبیوتیکی بر رشد لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از طریق مکمل سازی با آرد دافنی ماگنا (*Daphnia magna*). – مجلهٔ علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۳: ۵۹-۴۸.

ناصری، س.، نظامی، ش.، خارا، ح.، فروزانفر، ع و شکوری، م. ۱۳۸۷. تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک و آهن بر برخی فاکتورهای خونی آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). – مجلهٔ علوم زیستی واحد لاهیجان ۲: ۷۳-۸۱.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]

Arianto, A. and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture: Review. – Journal of Fish Diseases 25: 633-642.

Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfar, A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. – Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 8: 43-48.

Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M. 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *salmo salar,* L. – J. Fish Biol. 24: 333-338.

Blaxhall, P.C. 1972. The haematological assessment of the health of fresh water fish. – Journal of Fish Biol. 4: 593-604.

Chang, C.I.W and Liu, W.Y. 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla Anguilla* L. – Journal of Fish Diseases 25: 311-315.

Choi S.H. and Yoon, T.J. 2008. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) by dietary heat-inactivated potential probiotics. – Immune Net. 8: 67-74.

Farzanfar, A., Lashto Aghaei, G., Alizadeh, M., Bayati, M. and Ghorban, R. 2007. Study on growth performance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae with different concentration of probiotic in diet. – In: proceedings of Aquaculture, San Antonio, Texas, USA.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. – FEMS Immunology and Medical Microbiology 48: 149-158.

Firdaus, S., Jafri, A.K. and Rahman, N. 1994. Effects of iron-deficient diet on the growth and haematological characteristics of the catfish *Heteropueustes fossilis* Bloch. – Journal of Aquaculture in the Tropics 9: 179-185.

Gatlin, D.M. 2002. Nutrition and Fish Health. Fish Nutrition. – Academic Press, San Diego, CA, USA. 671 pp.

Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C. 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. – Aquaculture Nutr. 14: 289-299.

Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F. 2000. The use selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. – Aquaculture 9: 259-270.

Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. – Aquaculture 233: 1-14.

Houston, A.H. 1990. Blood and Circulation. Methods for Fish Biology. – American Fisheries Society, Bethesda, Maryland 9: 273-334.

Karimi, K. and Rahimi, S.H. 2004. The effects of different levels of probiotic on levels of fats and red cells of broilers. – J. Pejuohesh and Sazandeghi 62: 40-45.

Kurti, P. 2000. Microbial balance and optimal digestion in pigs. – International Pig Topics 16: 17-19.

Mehrim, A.I. 2009. Effect of dietary supplementation of Biogen (*Commercial probiotic*) on mono-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticu*) sunder differentstocking densities. – J. Fisher Aquatic Science 4: 261-273.

Mohan, B.R., Kadirvel, S.K., Natarajan, R. and Bhaskaran, M. 1996. Effect of probiotic supplementation on growth nitrogen utilization and serum cholestrol in broilers. – British Poultry Science 37: 395- 401.

Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous vibrio species in Penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. – Fish and Shellfish Immunology 29: 2-14.

Olafsen, J.A. 1998. Interactions between hosts and bacteria in aquaculture. – In Proceedings from the US-EC Workshop on Marine Microorganisms: Research Issues for Biotechnology. European Commission, Brussels, Belgium.

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 243: 241-254.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria Lactobacillus Rhamnosus JCM 1136. – Immunol. Immunopathol. 102: 379-388.

Reid, R.T., Live, D.H., Faulkner, D.J. and Butler, A. 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. – Nature 366: 455-458.

Serrano, P.H. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. – FAO Fisheries Technical Paper. 97 pp.

Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F. and Donnet-Hughes, A. 1997. Immune modulation of blood leucocytes in humans by lactic acid bacteria: Criteria for strain selection. American Journal of Clinical Nutrition 2: 515-520.

Song, Z., Wu, T., Cai, L. Zhang, L. and Zheng, X. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricumon* the growth performance and humoral

immune response in *Miichthys miiuy*. – J. Zhejiang Univ. Sci. 7: 596-602.

Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. – Fish Shellfish Immunol. 27: 440-445.

Wooldridge, K.G. and Williams, P.H. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. – FEMS Microbiology Reviews 12: 325-348.

Yanbo, W. and Zirong, X. 2006. Effect of probiotic for commom carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzymes activities. – Journal of Animal Feed Science and Technology 127: 283-292.

Azarin, H., Imanpoor, M.R., Rajabpour, M., Mehdinejad, M. and Jafar Nodeh, A. 2015. The effect of different levels of Fe $(So_4)_2$ $(7H_2O)$ and probiotics (BioPlus-2B) on some blood parameters of *Rutilus frisii kutum* fry. – Nova Biologica Reperta 2: 82-90.

آذرین، ه. ، ایمان‌پور، م.ر.، رجب‌پور، م.، مهدی‌نژاد، ن و علی جافرنوده. ۱۳۹۴. تأثیر سطوح مختلف آهن فریرون و پروبیوتیک بیوپلاس ب-۲ بر برخی پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۹۰-۸۲.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.2.1.0]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.2.82]