

## تأثیر سطوح مختلف آهن فریون 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

دانشکده 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 (فریون) بر برخی از پارامترهای خونی ۲۷۰ بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) با میانگین وزنی ۰/۴±۰/۱ 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±۱۰<sup>۶</sup>×۱/۶۵ 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 فمتولیترا، 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 دسی‌لیتر 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<sup>۹</sup>) در غذا بود بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و لنفوسیت را در این پژوهش نشان داد.

**واژه‌های کلیدی.** ماهی سفید، پارامترهای خونی، پروبیوتیک، بیوپلاس ب-۲

## The effect of different levels of Fe (So<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (7H<sub>2</sub>O) 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<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (7H<sub>2</sub>O) 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) (1.65×10<sup>6</sup>±1.55 per mm<sup>3</sup>), 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<sup>3</sup>) 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<sup>9</sup>) 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

## مقدمه

در حال حاضر هدف اصلی از صنعت آبی‌پروری، افزایش رشد و بقا، کارایی غذا و مقاومت در برابر موجودات آبی است که اثر مثبتی بر کاهش هزینه‌های تولید دارد (Gatlin, 2002). غذا یکی از پرهزینه‌ترین بخش‌های آبی‌پروری 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 از جمله پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Bageri et al., 2008). به کارگیری 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 صورت گرفته 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). روده 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 آبی 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 از طریق 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 به‌منزله افزودنی در جیره‌های غذایی طیور و آبزیان در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. این باکتری‌ها قادر به شکستن پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها (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 (Schiffirin et al., 1997). از این‌رو پروبیوتیک‌های باسیلوس می‌توانند اثرات تغذیه‌ای مثبتی در ماهی‌ها داشته باشند (Bagheri et al., 2008). از آنجا که جنس باسیلوس به‌عنوان پاتوژن ارگانسیم‌های آبی تا به حال گزارش نشده است (Moriarty, 1998)، کاربرد آن به طور وسیعی در صنعت آبی‌پروری 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، از جمله 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 میکروارگانسیم‌ها 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 نشان‌دهنده اهمیت و نقش ترکیبات

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 Liu و Chang 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 خوراندند. کلیه غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار گرفتند تا آب مخلوط‌شده با غذا تبخیر شود. جیره‌های آزمایشی جهت تغذیه بچه‌ماهیان در جدول شماره ۱ آمده است. میزان کل غذای مورد نیاز بچه‌ماهیان برای کلیه تیمارها بر اساس نتایج زیست‌سنجی (هر دوهفته یکبار) در هر-یک از آکواریوم‌ها قرار داده شد. 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 دوره آزمایش عبارت بود از: درجه حرارت:  $23/1 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد،  $pH: 8/5 \pm 0/4$ ، اکسیژن محلول:  $7/9$  میلی‌گرم در لیتر، سختی کل:  $300 \pm 0/2$  میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم، قلیائیت:  $275 \pm 0$  میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم و میزان فسفات:  $0/35 \pm 0/09$ .

آهن‌دار در رشد باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها در بدن میزبان است (Serrano, 2005). مفهوم غذاهای هدفمند در صنعت آبی‌پروری جدید است اما مدل جدیدی برای توسعه جیره‌های غذایی پدیدار آمده است 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 از طریق اضافه شدن به غذا، بر برخی پارامترهای خونی بچه‌ماهی سفید تحت بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرکز تحقیقات آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این تحقیق از ۲۷ آکواریوم به ابعاد  $40 \times 40 \times 60$  سانتی‌متر استفاده شد. نمونه‌های مورد استفاده ماهی سفید با میانگین وزن اولیه  $0/4 \pm 0/1$  گرم و میانگین طولی  $3/9 \pm 0/3$  سانتی‌متر و به تعداد ۲۷۰ عدد بود که در هر آکواریوم ۱۰ عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب و رها شد و به مدت ۶۰ روز تحت بررسی قرار گرفت. تحقیق مورد بررسی شامل ۹ تیمار بود و هر تیمار با سه تکرار انجام شد. فراورده میکروبی به کاررفته، یک نوع پروبیوتیک شامل دو گونه باکتری *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (به تعداد  $1/6 \times 10^9$  CFU) باکتری در هر گرم از پودر این فراورده و با نسبت ۱:۱ از هر دو سویه باکتری مذکور) و آهن به کاررفته نیز از آهن فریرون، هر یک میلی‌لیتر محتوی: ۱۲۵ میلی‌گرم فروس

جدول ۱- جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در تغذیه 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	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/6 \times 10^9$ CFU/gr
۲	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/2 \times 10^9$ CFU/gr
۳	جیره غذایی به همراه محلول آهن به مقدار ۷ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۴	جیره غذایی به همراه محلول آهن به مقدار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۵	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/6 \times 10^9$ CFU/gr و محلول آهن به مقدار ۷ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۶	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/6 \times 10^9$ CFU/gr و محلول آهن به مقدار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۷	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/2 \times 10^9$ CFU/gr و محلول آهن به مقدار ۷ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۸	جیره غذایی به همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به مقدار $1/2 \times 10^9$ CFU/gr و محلول آهن به مقدار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا
۹	جیره غذایی شاهد بدون مکمل‌سازی با پروبیوتیک و آهن

$$MCHC(\%) = \frac{10 \times \text{غلظت هموگلوبین}}{\text{هماتوکریٹ}}$$

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم جدول‌ها به ترتیب با استفاده از نرم-افزارهای کامپیوتری SPSS و Excel انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی بود و پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها، کلیه داده‌ها به وسیله 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  $p < 0.05$  مورد سنجش قرار گرفت.

### نتایج

مقایسه 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، هماتو کریت، 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. از نظر تعداد گلبول‌های قرمز بین تیمار ۵ با تیمار ۱، ۳، ۴، ۷ و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). از نظر میزان هموگلوبین، هماتو کریت و میزان MCV تیمار ۵ با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). تیمار ۵ با تیمار ۶ از نظر میزان MCH دارای اختلاف معنی‌دار نبود و با دیگر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ).

در پایان دوره ۶۰ روزه، پس از گذشت ۲۴ ساعت از قطع غذادهی، از ماهی‌های هر تکرار (۱۰ ماهی در هر تکرار) پس از 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 در کوتاه‌ترین 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 هماتو کریت با لوله‌های میکروهماتو کریت و توسط میکروسانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) و خط‌کش معمولی انجام گرفت.

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

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیه گسترش، به-وسیله 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; Cogswill et al., 2002).

(میانگین حجم گلبولی)

$$MCV(\text{fl}) = \frac{10 \times \text{هماتوکریٹ}}{\text{تعداد گلبول قرمز بر حسب میلیون عدد در میلی متر مکعب}}$$

(میانگین هموگلوبین گلبولی)

$$MCH(\text{pg}) = \frac{10 \times \text{هموگلوبین}}{\text{تعداد گلبول قرمز بر حسب میلیون عدد در میلی متر مکعب}}$$

(میانگین غلظت هموگلوبین گلبولی)

جدول ۲- مقایسه 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<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (7H<sub>2</sub>O) and probiotic (BioPlus-2B).

پارامترها	تعداد شاخص	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷	تیمار ۸
تعداد گلبول‌های سفید (میلی‌متر مکعب)	۶/۳ ± ۱/۳ <sup>ab</sup>	۶/۶ ± ۱ <sup>b</sup>	۶/۶ ± ۲ <sup>b</sup>	۶/۱۳ ± ۵/۷ <sup>b</sup>	۶/۳۳ ± ۱/۵ <sup>ab</sup>	۶/۱۳ ± ۶/۱ <sup>b</sup>	۶/۶ ± ۲ <sup>b</sup>	۶/۱۱ ± ۲/۸ <sup>b</sup>	۶/۱ ± ۱ <sup>a</sup>
تعداد گلبول‌های قرمز (میلی‌متر مکعب)	۱/۵۳ ± ۱/۵ <sup>c</sup>	۱/۵۷ ± ۱/۴ <sup>b</sup>	۱/۶۳ ± ۱/۴ <sup>ab</sup>	۱/۵۳ ± ۱/۹ <sup>c</sup>	۱/۵۷ ± ۱/۹ <sup>bc</sup>	۱/۶۵ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	abc ۱/۵۹ ± ۱/۸	۱/۵۶ ± ۱/۸ <sup>bc</sup>	۱/۵۸ ± ۱/۱ <sup>abc</sup>
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۶/۳۳ ± ۰/۵ <sup>c</sup>	۷/۰۳ ± ۰/۱ <sup>bc</sup>	۷/۲۰ ± ۰/۱ <sup>bc</sup>	۶/۸۳ ± ۰/۳ <sup>c</sup>	۷/۰۳ ± ۰/۵ <sup>bc</sup>	۷/۶۳ ± ۰/۸ <sup>a</sup>	۷/۳۳ ± ۰/۳ <sup>b</sup>	۶/۸۳ ± ۰/۵ <sup>c</sup>	۷/۱ ± ۰/۷ <sup>bc</sup>
هماتوکریت (درصد)	۲۰/۴۲ ± ۰/۳ <sup>bc</sup>	۲۰/۸ ± ۰/۸ <sup>bc</sup>	۲۱/۵۰ ± ۰/۳ <sup>bc</sup>	۲۰/۶ ± ۰/۱ <sup>c</sup>	۲۰/۳۳ ± ۰/۳ <sup>c</sup>	۲۴/۰۳ ± ۰/۸ <sup>a</sup>	۲۲ ± ۱/۷ <sup>b</sup>	۲۰/۶۰ ± ۰/۶ <sup>bc</sup>	۲۱/۷۰ ± ۰/۹ <sup>bc</sup>
MCV (فمتولیتر)	۱/۳۳ ± ۱/۶ <sup>bcd</sup>	۱/۳۳ ± ۳/۸ <sup>cd</sup>	۱/۳۱ ± ۲/۳ <sup>cd</sup>	۱/۳۱ ± ۲/۰ <sup>cd</sup>	۱/۲۹ ± ۲/۲ <sup>d</sup>	۱/۴۵ ± ۱/۴ <sup>a</sup>	۱/۳۸ ± ۶/۳ <sup>b</sup>	۱/۳۱ ± ۰/۵ <sup>cd</sup>	۱/۳۳ ± ۰/۸ <sup>bc</sup>
MCH (پیکوگرم)	± ۰/۱ <sup>bcd</sup> ۴۴/۵۸	۴۴/۷۵ ± ۰/۵ <sup>bcd</sup>	۴۴/۱۴ ± ۰/۷ <sup>cd</sup>	۴۴/± ۰/۵ <sup>bcd</sup>	۴۴/۹۰ ± ۰/۹ <sup>bc</sup>	۴۶/۹۹ ± ۰/۶ <sup>a</sup>	ab ۴۵/۵۵ ± ۰/۷	۴۳/۸۸ ± ۰/۵ <sup>d</sup>	۴۴/۷۸ ± ۰/۳ <sup>bcd</sup>
MCHC (درصد)	۳۳/۵۵ ± ۰/۲ <sup>bc</sup>	۳۳/۹۱ ± ۰/۵ <sup>ab</sup>	۳۳/± ۰ <sup>bc</sup>	۳۳/۵۱ ± ۰/۵ <sup>bc</sup>	۳۳/۶۵ ± ۰/۶ <sup>a</sup>	۳۱/۸۳ ± ۰/۵ <sup>d</sup>	bc ۳۳/۰۳	۳۳/۲۵ ± ۰/۵ <sup>bc</sup>	۳۲/۷۳ ± ۰/۴ <sup>cd</sup>
توروفیل (درصد)	۱۰ ± ۰ <sup>a</sup>	۷ ± ۰ <sup>c</sup>	۷ ± ۰ <sup>c</sup>	۸ ± ۰ <sup>bc</sup>	۸ ± ۰ <sup>bc</sup>	۸ ± ۰ <sup>bc</sup>	bc ۸/۳۳	۸ ± ۰ <sup>bc</sup>	۹/۳۳ ± ۰/۵ <sup>ab</sup>
لنفوسیت (درصد)	۹۰ ± ۰ <sup>b</sup>	۹۳ ± ۱/۵ <sup>a</sup>	۹۲ ± ۱/۵ <sup>a</sup>	۹۱/۳۳ ± ۰/۵ <sup>ab</sup>	۹۱ ± ۰ <sup>a</sup>	۹۲ ± ۲ <sup>a</sup>	± ۰/۵ <sup>ab</sup> ۹۱/۳۳	۹۲ ± ۰ <sup>a</sup>	۹۰ ± ۰ <sup>b</sup>

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 ایمنوگلوبین به واسطهٔ مکمل پروبیوتیک در بسیاری حیوانات از جمله ماهی گزارش شده است. Song و همکاران سطوح بالای ایمنوگلوبین را در موکوس پوست *Michthys miiuy* توسط کلستریدیوم بوتیریوم (*Clostridium butyrium*) گزارش کردند (Song et al., 2006). باکتری‌های مختلف اسیدلاکتیک (LAB)، گروهی از باکتری‌های پایدار و ناپایدار، سطوح ایمنوگلوبین را در ماهی بالا می‌برند (Panigrahi et al., 2005) و حتی یک هفته استفاده از پروبیوتیک‌ها مثل لاکتوباسیلوس‌ها به طور قابل توجهی سطوح ایمنوگلوبین 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 ( $p < 0.05$ ). 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 در نتیجه تیمار ۵ نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ دارای مقادیر بالاتری از این پارامترها می‌باشد. در آزمایش Mohan و همکاران غلظت هموگلوبین خون جوجه‌های گوستی با افزایش سطوح مختلف پروبیوتیک کاهش یافت که علت آن به خاطر رقابت پروبیوتیک با بدن برای تحویل اسیدفولیک غذا ذکر شده است، به این صورت که اسیدفولیک غذا، کمتر در دسترس بدن قرار می‌گیرد و به ایجاد علائم کم‌خونی منجر می‌شود (Mohan et al., 2009). در تحقیق حاضر نیز احتمالاً *B. subtilis* و *B. lisheniformis* برای جذب اسیدفولیک دارای رقابت فشرده‌ای 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-

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 از نظر درصد لنفوسیت با تیمار ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷ دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

## 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 به جز 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 چند هسته‌ای (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). در خصوص 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،

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)  $10^9 \times 1/6$  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 آبزی پرورشی 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.

*Oncorhynchus mykiss*) از طریق مکمل سازی با آرد دافنی ماگنا (*Daphnia magna*). - مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۳: ۴۸-۵۹.

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

های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت در ماهیانی که با جیره 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 موفقیت آمیز پروبیوتیک‌ها در روده بستگی دارد. چندین عامل که بر استقرار و ثبات پروبیوتیک‌ها و عملکردهای بعدی آن‌ها تأثیر 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 به دست آمد (Mehrim, 2009). از طرفی 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

### منابع / References

- اکرمی، ر.، قلیچی، ا و قرایی، ا. ۱۳۸۹. کاربرد پروبیوتیک‌ها در آبزی-پروری. - مجله علمی پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر ۴: ۸۴-۷۷.
- جعفریان، ح.، طاعتی کلی، م و نظریور، ع. ۱۳۸۸. بررسی اثر باسیل‌های پروبیوتیکی بر رشد لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

- 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 (*Oncorhynchus 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 *Heteropneustes 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 different stocking 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 cholesterol 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.
- Schiffirin, 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 butyricum* on 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 common 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<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (7H<sub>2</sub>O) 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 علی‌جافرنوده. 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: ۸۲-۹۰.