فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۲، جلد ۹، شماره ۱، زمستان۹۴، صفحه ۶۱ تا ۶۸

تأثیر باکتری(*Lactobacillus plantarum* KC426951) جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین کمان استان گیلان بر شاخص های خونی و ایمنی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

افشین قلجایی فرد[۱]، **حسین خارا[۱]**، علیرضا شناور ماسوله[۲]
۱–گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان. ایران. **hossein.khara1974@gmail.com**
۲– بخش بهداشت و بیماری های آبزیان موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
تاریخ دریافت:۹۴/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از پروبیوتیک ها در آبزی پروری باعث کاهش سطح ترکیبات ضد میکروبی(به ویژه آنتی بیوتیک ها)، بهبود ضریب تبدیل غذایی، تقویت سیستم ایمنی، بهبود فلور باکتریایی و فاکتورهای خونی می شود. این تحقیق اثرات باکتری(*Lactobacillus plantarum* (KC426951 جداسازی شده از روده قزل‌آلای رنگین کمان استان گیلان بر برخی شاخص های خونی و ایمنی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار می دهد.

روش کار: برای این منظور تعداد ۵۴۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزن ۲/۲۴±۳/۵۶ گرم(۳۰عدد در هر تکرار) تهیه شد. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ٦ تیمار و ۳ تکرار به مدت ٦۰ روز به صورت invivo بررسی گردید. جیره های آزمایشی شامل: 10^{6}(تیمار۱)، 10^{7}(تیمار۲)، 10^{8}(تیمار۳)، 10^{9} (تیمار٤) و 10^{10} (تیمار٥) CFU گرم بر لیتر لاکتو باسیلوس پلانتاروم و تیمار شاهد(تیمار٦) بدون مکمل سازی با پروبیوتیک بود. در انتهای دوره آزمایش شاخص های خونی و ایمنی اندازه گیری شد.

یافته ها: بالاترین سطوح شاخص های خونی شامل گلبول های سفید خون در تیمار ٤، گلبول قرمز خون، غلظت هموگلوبین خون، درصد هماتوکریت، درصد منوسیت، درصد ائوزینوفیل، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی در تیمار٥، متوسط حجم گلبول قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و درصد ائوزینوفیل در تیمار ۱ و درصد نوترفیل در گروه شاهد، مشاهده گردید. هم چنین اختلاف معنی دار آماری بین تیمارهای مورد بررسی، در متوسط غلظت هموگلوبین سلولی، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز، درصد منوسیت و درصد ائوزینوفیل مشاهده نگردید($p>0/05$). هم چنین بیشترین مقادیر فاکتورهای ایمنی خون شامل توتال ایمونوگلوبین، IgM و لیزوزیم متعلق به تیمار ٤ و پایین ترین مقادیر آن متعلق به گروه شاهد بود($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته های این تحقیق نشان داد که محدوده ی به کارگیری باکتری *Lactobacillus plantarum* را می توان دوز10^{9}– 10^{10} CFU/باکتری بر گرم غذا به عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی معرفی نمود.

واژه های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، باکتری اسید لاکتیک، *Lactobacillus plantarum* ، شاخص های خونی، شاخص های ایمنی.

مقدمه

امروزه با رشد فزاینده جمعیت، تأمین پروتئین حیوانی یکی از ضروریات مبرم جامعه به حساب می آید و در این میان پروتئین ماهی جایگاه ویژه ای دارد(۴). لذا با گسترش صنعت پرورش آبزیان، وقوع بیماری های عفونی از جمله بیماری های باکتریایی اجتناب ناپذیر است(۴۴). یکی از معمول ترین روش های درمان این عفونت ها، استفاده از آنتی بیوتیک ها می باشد این در حالی است که استفاده بیش از حد از این داروها باعث بروز مقاومت باکتریایی در این حیوانات می شود(۴۳). توسعه مقاومت باکتریایی علیه آنتی بیوتیک های مورد استفاده روز بروز در حال ازدیاد می باشد(۴۴). بنابراین رفته رفته توجه محققین به استفاده از پروبیوتیک ها افزایش می یابد(۴۵). تأثیرپروبیوتیک ها در تغذیه، مقاومت در برابر بیماری ها و دیگر فعالیت های مفید به

اثبات رسیده است که از جمله اثرات مفیدی که بر سلامتی دارند تأثیر بر روی سیستم ایمنی و تحریک سیستم ایمنی است(۹). لذا استفاده از پروبیوتیک ها باعث ایجاد یک مقاومت قابل ملاحظه ای در ماهی ها در برابر بیماری ها می شود(۵). این مقاومت در نتیجه ی تحریک سیستم ایمنی به وسیله افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و ضد میکروبی صورت می گیرد(۱۵). پروبیوتیک ها در حقیقت قسمتی از میکروفلور دستگاه گوارش شده و به سلامت میزبان خود کمک می نماید. این عمل با چسبیدن آن ها به مخاط روده و تولید متابولیت های ضد میکروبی و به طور کلی رقابت با میکروارگانیسم های پاتوژن می باشد(۲۲). پروبیوتیک ها از لحاظ نوع سویه میکروبی موثرشان به سه گروه تقسیم می شوند، پروبیوتیک های باکتریایی، قارچی و مخمری. استفاده از پروبیوتیک های حاوی باکتری های اسید لاکتیک به افزایش میزان زنده مانی میزبان در مواجه با عوامل بیماری‌زا منجر می شوند(۲۲). تحقیق حاضر اثر باکتری اسید لاکتیک *Lactobacillus plantarum* (KC426951) در جیره غذایی روی برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) به صورت Invivo به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. تاکنون در زمینه افزودن باکتری بومی لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان به ویژه در سن رشد(بچه ماهی) جهت پرورش آن ها در مزارع پرورشی، مطالعه علمی و عملی و نیز بررسی اثر غذای حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم روی عوامل خونی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان به انجام نرسیده است. لذا نتایج این تحقیق می تواند حائز اهمیت بوده و مورد بهره برداری کارگاه ها و مراکز دولتی و خصوصی پرورش ماهیان سردآبی قرار گیرد.

مواد و روش ها

اجرای این تحقیق در کارگاه خصوصی پرورش ماهی سردآبی قزل آلای اشکرآب واقع در شهرستان سیاهکل در استان گیلان انجام شد. ابتدا بچه ماهیان با میانگین وزنی ۲/۲۴±۳/۵۶ گرم در ۶ کانال به طور مساوی در قالب ۵ تیمارآزمایشی و۱ تیمارشاهد با ۳ تکرار(هر تکرار ۳۰ ماهی) به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی(اکسیژن، دما و pH) با غذای کنستانتره متداول مورد استفاده برای تغذیه بچه ماهیان قزل آلا تغذیه و به مدت ۶۰ روز نگهداری گردیدند. آب ورودی از رودخانه و با دبی ۱ تا ۱/۵ لیتر در ثانیه همراه با هوادهی وارد هر کانال می شد. فرآورده ی میکروبی مورد استفاده ، باکتری اسید لاکتیک *Lactobacillus plantarum* جداسازی شده توسط شناور ماسوله(۱۳۹۱) از روده قزل آلای رنگین کمان استان گیلان می باشد که با روش مولکولی SrRNA۱۶ مورد شناسایی و در NCBI مورد ثبت قرارگرفت(KC426951). پودر اولیه حاوی $۱۰^{۱۱}$–$۱۰^{۱۲}$ از باکتری *Lactobacillus plantarum* می‌باشد. به منظور تغذیه بچه ماهیان یک نوع غذای خشک پلت از شرکت چینه با سایز هاSFT2(۵-۳ گرم)، SFT3 (۵-۱۰گرم)، FFT1(۱۰-۲۰گرم)، FFT2(۲۰-۳۰گرم) و GFT1(۳۰-۱۰۰گرم) انتخاب گردید. قابل ذکر است که پیش از اجرای آزمایش، ارزش غذایی جیره خشک فوق از لحاظ سطوح چربی، پروتئین و رطوبت مورد سنجش قرار گرفت که به ترتیب شامل مقادیر ۱۴ ٪، ۴۰ ٪ و ۱۱ ٪ بود . برای آماده سازی جیره های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مقدار پروبیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار مطابق روش مورد استفاده Merrifield و همکاران(۳۲)، به سرم فیزیولوژی اضافه شد، که با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت های مختلفی از این باکتری از دوزهای $۱۰^{۶}$– $CFU۱۰^{۱۰}$ بر گرم غذا تهیه، سپس روی غذا اسپری گردید. در ضمن به بچه ماهیان سه تکرار تیمار شاهد(۶)، غذای پلت

اسپری شده با سرم فیزیولوژی خورانده شد(جدول ۱). کلیه ی غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار داده شد تا سرم مخلوط شده با غذا تبخیر گردد.

شاخص های خونی و ایمنی

بعد از ۸ هفته پرورش وگذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۳ عدد از ماهی های هر تکرار به طور تصادفی صید گردیدند، مراحل بیهوشی توسط تریکائین متان سولفونات(pH:7) (MS222)، با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر(۳۸) انجام شد، با روش خون گیری از سیاهرگ ساقه دمی(۸) ۲ سی سی خون از هر تکرار گرفته شد، سپس ۰/۵ سی سی به داخل تیوپ های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون(هپارین) ریخته شد و سپس شاخص های خونی شامل تعداد گلبول های قرمز و سفید خون(۷)،(۱۰)،(۲۸)، تعیین هماتوکریت(۲۸، ۲۴)، غلظت هموگلوبین(۲۸، ۷)، متوسط حجم گلبول قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی(۲۸، ۱۴)، درصدلنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل تعیین گردید(۲۸، ۲۱، ۷). ۱/۵ سی سی باقی مانده به داخل اپندروف غیر هپارینه جهت مطالعه ی فاکتورهای ایمنی جهت تعیین توتال ایمونوگلوبین،IgM (۲۶، ۷)، لیزوزیم(۳۱، ۲۰)، ریخته شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی(Completery Randomyzed Design) و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه(One-way ANOVA) و تست(Tukey) به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگین ها مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. اختلافات بین میانگین ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان$p<۰/۰۵$ تعیین گردید. کلیه عملیات مربوط به وسیله نرم افزار SPSS17 مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ۱- جیره های آزمایشی مورد استفاده جهت تغذیه بچه ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار	جیره
تیمار ۱	۱۰mg/10 Kg food از دوز $CFU۱۰^{۶}$ باکتری بر گرم غذا
تیمار ۲	۱۰۰mg/10 Kg food از دوز $CFU۱۰^{۷}$ باکتری بر گرم غذا
تیمار ۳	۱۰۰۰mg/10 Kg food از دوز $CFU۱۰^{۸}$ باکتری بر گرم غذا
تیمار ٤	۱۰۰۰۰mg/10 Kg food از دوز $CFU۱۰^{۹}$ باکتری بر گرم غذا
تیمار ٥	۱۰۰۰۰۰mg/10 Kg food از دوز $CFU۱۰^{۱۰}$ باکتری بر گرم غذا
شاهد	غذای خشک پلت + سرم فیزیولوژی

نتایج

فاکتورهای خونی

در انتهای دوره آزمایش با توجه به مقادیر جدول ۳، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعدادگلبول های قرمز در تیمار ۵ بیشتر از گروه کنترل بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی دار بود($P<۰/۰۵$)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز در تیمار ۱ بیشتر از گروه کنترل بود لیکن از لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده نشد($P>۰/۰۵$)(جدول۲)، متوسط غلظت هموگلوبین سلولی تیمار ۵ بیشترین مقدار و تیمار ۲ کم ترین مقدار بود ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نبود($P>۰/۰۵$)(جدول۳)، تعداد گلبول های سفید در تیمار ۴ بیشتر از گروه شاهد بود و از لحاظ آماری این اختلاف معنی دار بود($P<۰/۰۵$)(جدول۳)، نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول های سفید نشان داد که مقدار درصد لنفوسیت شاهد بیشتر از گروه دریافت کننده پروبیوتیک بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی-داربود($p<۰/۰۵$)(جدول۲)، در بررسی درصد منوسیت مشاهده گردیدکه تیمار ۵ بیشترین و گروه شاهد کمترین مقدار بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده

نشد($P>0/05$)(جدول۳)، حداکثر مقدار نوتروفیل متعلق به تیمار ۵ بود و حداقل مقدار آن متعلق به گروه کنترل بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی دار بود($P<0/05$)(جدول۳)، ضمناً میزان ائوزینوفیل در گروه ۱ بیشتر از گروه کنترل و ۳ مشاهده گردید ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نبود($P>0/05$) (جدول۲).

فاکتورهای ایمنی

با توجه به مقادیر مندرج در جدول ۴، میزان توتال ایمونوگلوبین، IgM و لیزوزیم در گروه دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی دار بود($P<0/05$)(جدول۳).

جدول ۲- نتایج فاکتورهای خونی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای شاهد و آزمایشی در پایان ۶۰ روز تغذیه با *Lactobacillus plantarum*

	شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار٤	تیمار٥
گلبول قرمز($10^6/mm^3$)	^{a} ۷۰۹۰۰۰ ± ۱۴۴۲۲/۲	^{b} ۷۶۷۶۶۶/۷ ± ۲۶۵۷۶/۹	^{bc} ۸۰۸۰۰۰ ± ۱۲۱۲۴/۴	^{cd} ۸۳۳۰۰۰ ± ۶۵۵۷/۴	^{de} ۸۶۰۳۳۳/۳ ± ۲۷۰۶۱/۷	^{e} ۸۹۸۳۳۳/۳ ± ۱۰۴۰۸/۳
گلبول سفید($10^3/mm^3$)	^{a} ۶۳۳۳/۳ ± ۳۷۸/۶	^{b} ۸۵۰۰ ± ۸۱۸/۵	^{b} ۸۵۰۰ ± ۲۰۰	^{bc} ۹۲۶۶/۷ ± ۳۲۱/۵	^{d} ۱۰۸۳۳/۳ ± ۷۰۲/۴	^{cd} ۹۹۰۰ ± ۲۶۴/۶
هموگلوبین (g/dl)	^{a} ۸/۶ ± ۰/۲۶	^{b} ۹/۷ ± ۰/۲	^{bc} ۱۰/۱ ± ۰/۴۱	^{cd} ۱۰/۴ ± ۰/۱	^{de} ۱۰/۷ ± ۰/۳۱	^{e} ۱۱/۲ ± ۰/۱۵
هماتوکریت (٪)	^{a} ۳۳/۶۷ ± ۱/۵۳	^{ab} ۳۹ ± ۱	^{bc} ۴۰/۶۷ ± ۰/۵۸	^{c} ۴۱ ± ۱	^{c} ۴۱/۳۳ ± ۰/۵۸	^{c} ۴۲ ± ۲
متوسط حجم گلبول قرمز	^{ab} ۴۸۰/۳ ± ۱۵/۳	^{b} ۵۰۸/۷ ± ۳/۸	^{ab} ۵۰۳/۳ ± ۱۳/۲	^{ab} ۴۹۲ ± ۹/۸۵	^{ab} ۴۸۰/۷ ± ۲۰	^{a} ۴۶۴ ± ۱۸/۷
(٪)غلظت هموگلوبین	^{a} ۲۵/۳ ± ۰/۵۷	^{a} ۲۴/۸ ± ۰/۱۵	^{a} ۲۴/۷ ± ۰/۸۷	^{a} ۲۵/۳۷ ± ۰/۵۵	^{a} ۲۵/۹ ± ۰/۹	^{a} ۲۶/۰۳ ± ۱/۶
هموگلوبین گلبول قرمز (pg)	^{a} ۱۲۱/۳ ± ۱/۱۶	^{a} ۱۲۶/۳ ± ۱/۵	^{a} ۱۲۴ ± ۱	^{a} ۱۲۴/۷ ± ۰/۵۸	^{a} ۱۲۴ ± ۱	^{a} ۱۲۲/۳ ± ۳/۸
منوسیت(٪)	^{a} ۱/۶۷ ± ۰/۵۸	^{a} ۳ ±۱	^{a} ۳ ± ۱	^{a} ۳/۶۷ ± ۱/۱۶	^{a} ۳/۶۷ ± ۰/۵۸	^{a} ۴ ± ۱
نوتروفیل (٪)	^{a} ۲۸ ± ۱	^{ab} ۳۱ ± ۱	^{bc} ۳۳/۶۷ ± ۱/۵۳	^{cd} ۳۶ ± ۱	^{cd} ۳۶/۶۷ ± ۱/۵۳	^{d} ۳۹ ± ۱
ائورنوفیل (٪)	^{a} ۱ ± ۰	^{a} ۱/۵ ± ۰/۷۱	^{a} ۱/۳۳ ± ۰/۵۸	^{a} ۱ ± ۰	^{a} ۱/۳۳ ± ۰/۵۸	^{a} ۱/۳۳ ± ۰/۵۸
لنفوسیت(٪)	^{d} ۶۹/۶۷ ± ۱/۵۳	^{cd} ۶۵± ۲	^{bc} ۶۲ ± ۲/۶۵	^{ab} ۵۹/۶۷ ± ۱/۵۳	^{ab} ۵۸/۳۳ ± ۰/۵۸	^{a} ۵۶ ± ۲

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P ۰/۰۵).

جدول ۳- نتایج فاکتورهای سرمی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای شاهد و آزمایشی در پایان۶۰ روز تغذیه با *L.plantarum*

	شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار٤	تیمار٥
ایمونوگلوبین کل(g/dl)	^{a} ۱۰/۷۷ ± ۰/۵۵	^{bc} ۱۲/۷ ± ۰/۶۲	^{b} ۱۲/۲ ± ۰/۸	^{c} ۱۴/۱۷ ± ۱/۰۴	^{d} ۲۰/۳۳ ± ۱/۱۵	^{d} ۱۹/۳۷ ± ۳/۵۵
IgM (mg/dl)	^{a} ۱۴ /۶۷ ± ۵/۵۱	^{ab} ۲۱/۳۳± ۰/۵۸	^{bc} ۲۸/۳۳ ± ۷/۰۲	^{bc} ۲۷/۳۳ ± ۳/۰۶	^{d} ۳۹± ۲/۶۵	^{cd} ۳۲ ± ۲/۶۵
لیزوزیم (U/ml)	^{a} ۱۸/۳۳ ± ۵/۱۳	^{c} ۳۷ ± ۶/۲۵	^{bc} ۳۱/۳۳ ± ۲/۰۸	^{ab} ۲۴/۶۷ ± ۲/۵۱	^{c} ۴۰/۶۷ ± ۲/۰۸	^{c} ۳۷/۳۳ ± ۱۰/۵

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P ۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

فاکتورهای خونی

پارامترهای هماتولوژی شاخص خوبی برای ارزیابی سلامت ماهی هستند(۴۱). پارامترهای خونی به عنوان شاخص های فیزیولوژیکی در پاسخ به تغییرات خارجی یا داخلی در ماهیان مورد استفاده قرار می گیرند(۱۸)، اصولاً پارمترهای خونی نشانه ای از وضعیت فیزیولوژیک موجود بوده و می تواند تحت تأثیر مواد غذایی خورده شده توسط آن جانور باشد(۴۶، ۲۹، ۲۷، ۲۳). هم چنین نشان داده شده که این پارامترها به وسیله پروبیوتیک ها تحت تأثیر قرار می گیرند(۲۵، ۱۶). لذا در این تحقیق سعی شد که با تجویز پروبیوتیک همراه با جیره غذایی شاخص های خونی و ایمنی بهبود یابد، تجزیه و تحلیل

یافته ها نشان داد که افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* در جیره غذایی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان باعث افزایش تعداد گلبول های سفید خون در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به شاهد شده است که می تواند نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی محسوب می شود، زیرا لکوسیت ها از منابع اصلی تولید لیزوزیم به شمار می روند(۱)، که با مطالعه ی Irianto و Austin(۲۵)، Brunt و همکاران(۱۶)، Newaj و همکاران(۳۵)، توکلی و اخلاقی(۳)، Ali و همکاران (۱۲) و شناور و همکاران(۶) مطابقت دارد. هم چنین نتایج نشان داد که تیمار ۵ نسبت به گروه شاهد دارای گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون بیشتری بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی داری داشته است. با توجه به این که تقریباً تمام اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می گردد به هموگلوبین موجود در گلبول قرمز خون متصل می باشد(۳۳). از این رو شباهت نتایج به دست آمده از اندازه گیری غلظت هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول های قرمز، دارای رابطه-ای منطقی می باشد که نتایج مشابهی نیز توسط Raida و همکاران(۳۸)، Brunt و همکاران(۱۶)، Newaj و همکاران(۳۵) و Danielle و همکاران(۱۹) به دست آمد. هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد(۴۲). افزایش درصد هماتوکریت در تیمارهای پروبیوتیکی مشابه مطالعه AL-Dohail و همکاران(۱۱) بر روی گربه ماهی آفریقایی می باشد. نتایج فوق الذکر نشان داد که بیشترین حجم گلبول قرمز در تیمارهای ۱،۲ و۳ و کمترین در تیمار ۵ می باشد. کاهش حجم گلبول-های قرمز نشان دهنده عدم وجود التهاب است که سبب حرکت و تعلیق گلبول های قرمز شده و سرعت رسوب آن ها و تشکیل لخته های درون رگی را کاهش می دهد که یک ویژگی مثبت در فیزیولوژی دستگاه گردش خون محسوب می شود(۸)،که این نتیجه با مطالعه شناور و همکاران(۶) مشابهت دارد. با توجه به نتایج فوق بیشترین مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز خون در تیمار ۱ و کمترین در گروه شاهد بود. افزایش میزان هموگلوبین گلبول قرمز در پایان دوره در تیمارهای حاوی *L.plantarum* نسبت به شاهد نشان دهنده اثر مثبت پروبیوتیک بر میزان هموگلوبین و قابلیت انتقال گازهای تنفسی توسط هموگلوبین است(۴۲) ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده نشد. بین تیمارهای مختلف با گروه شاهد در پایان دوره ۶۰ روزه اختلاف معنی دار آماری بین متوسط غلظت هموگلوبین سلولی و متوسط هموگلوبین گلبول قرمز مشاهده نشد که نتایج مشابهی نیز توسط Raida و همکاران(۳۸)، Brunt و همکاران(۱۶)، Newaj و همکاران(۳۵) و Danielle و همکاران(۱۹) به دست آمد. هم چنین در گروه های پروبیوتیکی درصد منوسیت و ائوزینوفیل نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده و لی از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. شناور و همکاران(۶) نیز در مطالعه بر روی تاس ماهی ایرانی اختلاف معنی داری در تیمارها و شاهد منوسیت خون مشاهده نکردند. در مطالعه حاضر با افزایش دوز پروبیوتیک در تیمارها درصد لنفوسیت نسبت به شاهد کاهش داشته و ممکن است به دلیل افزایش IgM در تیمارها، نیاز به افزایش لنفوسیت کاهش یافته باشد که مشابه مطالعه شناور و همکاران(۶) بر روی تاس ماهی ایرانی می باشد. با افزایش مصرف پروبیوتیک در تیمارها نوتروفیل نیز نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری داشته است. نوتروفیل ها در مهره داران قادر به تولید آنیون های سوپر اکسید($O2^-$) هستند که معیاری برای فعالیت انفجار تنفسی بوده و بسیار میکروب کش هستند(۳۴).

فاکتورهای ایمنی خون

یکی از فاکتورهای مورد بررسی به منظور دست یابی به شرایط سیستم ایمنی، فاکتور لیزوزیم می باشد این

آنزیم به دنبال تزریق فرآورده های میکروبی، در پاسخ به عفونت های باکتریایی و جیره غنی با پروبیوتیک در سرم ماهیان افزایش می یابد(۲). لیزوزیم توسط لکوسیت ها که در بافت های مختلف و خون توزیع شده است ترشح می شود(۴۰). نتایج به دست آمده از میزان لیزوزیم و توتال ایمونو گلوبین سرم حاکی از آن است که لیزوزیم سرم در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود که در همین خصوص دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران(۱۷)، Newaj و همکاران(۳۵)، Salah Mesalby و همکاران(۳۹)، توکلی و اخلاقی(۳)، Austin و همکاران(۱۳)، Panigrahi و همکاران(۳۷) و شناور و همکاران(۶)نیز نتایج مشابهی دست یافتند. نقش لیزوزیم در عفونت به عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آن ها و هم چنین تحریک فاگوسیتوز می باشد(۳۵). در تحقیق حاضر IgM به عنوان فاکتوری از ایمنی اختصاصی نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان IgM در تیمار های پروبیوتیکی از گروه شاهد بیشتر بود، بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۴ و ۵ بود که بیشترین کانت باکتری های اسید لاکتیک را داشته مشاهده شد. آنتی ژن های سطح باکتری های اسید لاکتیک با متابولیت هایشان ممکن است نقش ایمونوژن را برای دفاع و ایمنی بدن ایفا نمایند. از آن جا که باکتری های پروبیوتیکی تولید آنتی بادی را در مهره-داران تحریک می کنند(۳۰)، پس می توان انتظار داشت که سطح IgM در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد بالاتر باشد که با مطالعه Nikoskelainen و همکاران(۳۶)، Panigrahi و همکاران(۳۷)، Al-Dohail و همکاران(۱۱)، Austin و Sharifuzzman(۱۳) و شناور و همکاران(۶) مطابقت داشت.با توجه به نتایج به دست آمده، بالا بودن میزان گلبول های سفید خون در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به شاهد نشان دهنده ی تولید فاکتورهای ایمنی توسط گلبول های سفید(لوکوسیت ها، نوتروفیل ها) و به تبع آن تولید IgM، ایمونوگلوبین و لیزوزیم خواهد بود هم چنین بالا بودن گلبول قرمز خون در تیمارهای حاوی باکتری اسید لاکتیک نسبت به شاهد می تواند بیان گر سلامت و تقویت سیستم خونی ماهی قزل آلا و افزایش سطح اکسیژن رسانی در آبشش ها در شرایط استرس زا نظیر کاهش اکسیژن و تغییرات محیطی دیگر باشد. پس محدوده ی به کارگیری باکتری *Lactobacillus plantarum*، دوزهای 10^{9}-10^{10}CFU/باکتری بر گرم غذا می باشد که می تواند تحریک کننده سیستم ایمنی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تلقی شود.

تقدیر و قدردانی

در این جا لازم است از کلیه دوستان خصوصاً مهندس پوردهقان، دکتر محسنی، دکتر نصیری، مهندس سعیدی و مهندس اسکندری که ما را صمیمانه در انجام این امر یاری نمودند تقدیر و تشکر بنماییم.

منابع

۱-اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، احمدی، ا.۱۳۹۰. تأثیر پروبیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون ماهیان(*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره۶۶،شماره۲، ۱۳۲-۱۳۶.

۲-تکمه چی، ا. ۱۳۸۶. تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکئی (به عنوان یک پروبیوتیک) بر روی برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته میکروبیولوژی. شماره ۳۲-۱. دانشگاه ارومیه. ایران.

۳-توکلی، ه.، اخلاقی، م. ۱۳۸۸. بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبین، گلبول ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۲. صفحات ۱۵۷ تا ۱۶۲.

٤– ستاری، م. ۱۳۷۸. بهداشت ماهی ۱. انتشارات دانشگاه گیلان. ۲۸۴ صفحه.

٥–شجاعی، م.، دادور، پ.، بهشتی روی، س. ۱۳۸۹. پروبیوتیک ها در پرورش ماهی. مجموعه مقالات اولین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فرآویژه. صفحات ۳۷۳–۳۷۴.

٦–شناور ماسوله، ع.۱۳۹۱. شناسایی باکتری های اسید لاکتیک روده بچه تاسماهیان ایرانی(*Acipenser persicus*) و کارآیی آن ها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمونو فیزیولوژی. رساله دکتری. دانشکده دامپزشکی گروه بیماری های آبزیان دانشگاه تهران.۱۴۰ صفحه.

۷– عامری مهابادی، م. ۱۳۷۸. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

۸–کاظمی، ر. الف.، پوردهقانی، م.، یوسفی، الف.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م.۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ صفحه.

۹–کامکار، م.، قانع، م.، پورغلام، ر.، قیاسی، م. ۱۳۹۰. بررسی تأثیر*Bacillus subtilis* به عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) به دنبال عفونت تجربی با *Sterptococcus iniae*. دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران.۱۳ص.

۱۰–مجابی، ع.، حیدر نژاد، ا. ۱۳۸۲.خون شناسی دامپزشکی و روش های آزمایشگاهی. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۲۱۴ صفحه.

11. Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus, Burchell 1822*) fingerling. Aquac Res, 40;1642-1652.

12. Ali, H.M., Ghazalah, A.A., Gehad, E.A. (2010). Practical aspects and immune response of probiotics preparations supplemented to nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) diets. Nature and Science, 8; 39-45.

13. Austin, B., Sharifuzzaman, S.M. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, 27; 440–445.

14. Anderson, D., Klontz, GW. (1965). Basic haematology for the fishculturist. Ann. Northw. Fish Cult. Conf, 16; 38 – 41.

15. Balcazar, J.L. (2003). Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.

16. Brunt, J., Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and Streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish. Dis., 28; 693-701.

17. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Diseases, 30; 573–579.

18. Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S. (1998). Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes); effects of temperature and stress. Comp. Biochem. Physiol., 121A; 351–354.

19. Danielle, C. (2010). Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*. Fed Probiotics,

20. Ellis, A.E. (1990). Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. In: Pickering A. D. (Ed). Stress and fish. Academic Press, London. Pp; 147-169.

21. Gao, Z.; Wang, W.; Abbas, K.; Zhou, X.; Yang, Y.; Diana, J. S. (2007). Haematological characterizationof loach *Misgurnus anguillicaudatus*: a comparison amongdiploid, triploid and tetraploid specimens. Comp. Biochem.Physiol, A147; 1001–1008.

22. Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. Review. Aquaculture, 180;147-165.

23. Hemre, G.-I., Sandnes, K., Lie, Ø., Waagbø, R. (1995). Blood chemistry and organ nutrient composition inAtlantic salmon (*Salmo salar*) fed graded amounts of wheat starch. Aquac. Nutr. 1; 37–42.

24. Houston, A.H. (1990). Blood and circulation. In: Moyle (ed) Methods for fish biology. Am Fish Soc, 273–334?

25. Irianto, A., Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 25; 333-342.

26. Khoshbavar–Rostami, HA. Soltani, M. Hassan, MD. (2006). Some hematological and biochemical changes in blood serum of beluga(*Huso huso*) after chronic exposure to diazinone. Iran J Fish Sci., 5(2);53–66.

27. Klinger, R. C., Blaer, V. S., Echevarria, C. (1996). Effect of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquacultur, 147; 225-233.

28. Klontz, G.W. (1994). Fish hematology. in: techniques in fish immunology, Stolen, J.S., T.C. Flecher, A.F. Rowely, T.C. Zelikoff, S.L. Kaattari and S.A. Smith (Eds.). Vol. 2, SOS Publications, USA. ISBN: 0962550582, pp; 121-132.

29. Kumar, R., S.C. Mukherjee, Prasad, K.P., Pal, A.K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquacult. Res., 37; 1215-1221.

30. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M. (1996). Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with

Lactobacillus GG. Ann Nutr Metabolism.; 40;137–45.

31. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. (2009). Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microflora and related health criteria post antibiotic treatment. Aquacult. Nutr., 16(5); 496-503.

32. Merrifield, D.L., Bradley,G., Harper,G.M., Baker,R.T.M., Munn,C.B., Davies,S.J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition, 17; 73-79.

33. Michael, M.K., Nelson, D.L. (2000). Leninger principles of biochemistry. 3rd. ed. Cox.

34. Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth. A.J., Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Dev Comp Immunol, 25;807-825.

35. Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). Bacillus subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*). Applied Microbiology, 103; 1699-1706.

36. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G.,Salminen, S., Lilius, E. M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchu smykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillusrhamnosus*). Fish Shelfish. Immunol, 15; 443-452.

37. Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Statoh, S., Sugita. H. (2005). The Viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 243; 241-254.

38. Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E., Buchmann, K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*, 26; 495-498.

39. Salah Mesalhy, A., Mohamed Fathi M., George J. (2008). Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture research, 39; 647–656.

40. Sveinbjornsson, B., Olsen, R., Paulsen, S. (1996). Immuno cytochemical localization of lysozyme in eosinophilic granular cells of *Atlantic salmon*. J. Fish. Dis, 19; 349-355.

41. Svobodova, Z., Pravda, D., P-alachova, J. (1991). Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish culture and Hydrobiology, Vodnary, Methods, 20; 31.

42. Tangestani, M.H., Jaffari, L., Vincent, R.K. and Maruthi Sridhar, B.B. (2011). Spectral characterization and ASTER-based lithological mapping of an ophiolite complex: A case study from Neyriz Ophiolite, SW Iran. Remote Sensing of Environment, 115; 2243-2254.

43. Tuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance laboratory of Food microbiology, Curr Opin Microbiol, 4(5);493-90.

44. Vander Waaij, D., Nord, C.E. (2000). Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria: an analysis and a new approach to this urgent problem. International Journal of Antimicrobial Agents, 16;191-197.

45. Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candiadate probiotic and pathogenic bacteria of fish intestinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27;319-326.

46. Waagbo, R., Sandnes K., Lie, O. (1998). Effects of inositol supplementation on growth, chemical composition and blood chemistry in *Atlantic salmon, Salmo salar L.,* fry. Aquac. Nutr, 4; 53-59.