فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۳، جلد ۶، شماره ۴، پائیز ۹۲، صفحه ۱ تا ۱۳

بررسی اثرات پروبیوتیک باکتوسل واسید فولیک برفاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris* Lovetsky 1829)

نگین دلسوز خاکی[۱]، **حسین خارا[۲]**، محمود محسنی[۳]، علیرضا شناور ماسوله[۳]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، کارشناس ارشد گروه شیلات، لاهیجان. ایران. **h.khara1974@yahoo.com .**
۲ – دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان. ایران.
۳- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت. ایران.
تاریخ دریافت:۹۲/۷/۲۵ تاریخ پذیرش:۹۲/۹/۱۷

چکیده
زمینه وهدف: ماهی شیپ از جمله ماهیان خاویاری دریای خزر است که برای آبزی پروری مناسب می باشد. پروبیوتیک ها اثرات مفیدی بر سلامتی و رشد موجود میزبان دارند. هدف از این پژوهش بررسی اثر *Pediococcus acidilactici* و اسید فولیک برفاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهیان شیپ است.
روش کار: تعداد ۲۱۰ عدد بچه ماهی شیپ با تراکم ۱۰ عدد در هر وان فایبرگلاس در ۷ گروه: تیمار۱ (٤ میلی‌گرم اسید فولیک)، تیمار۲(پروبیوتیک ۳۰۰ گرم)، تیمار۳(اسیدفولیک ٤ میلی‌گرم و پروبیوتیک ۲۰۰ گرم)، تیمار٤ (اسیدفولیک ۲ میلی‌گرم پروبیوتیک ۳۰۰ گرم)، تیمار٥ (اسید فولیک ۲ میلی‌گرم و پروبیوتیک ۲۰۰)، تیمار٦ (اسید فولیک ٤ میلی‌گرم و پروبیوتیک ۳۰۰ گرم) تیمار ۷ شاهد در ۳ تکرار به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان آزمایش شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی در آن‌ها اندازه گیری شد.
یافته ها: بیشترین اختلاف معنی دار تعدادگلبول سفید در تیمار٦ مشاهده گردید. ائوزینوفیل هیچ یک از تیمارها با هم اختلاف معنی داری نداشتند. کمترین میزان نوتروفیل و بیشترین میزان لنفوسیت در تیمار شاهد بود. بیشترین تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت در تیمار ٦ و کمترین این شاخص در شاهد، مشاهده گردید. MCH و MCHC تیمارها، اختلاف معنی داری با هم نداشتند اما بیشترین MCV در تیمار ٤ با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار داشت. بیشترین مقدار لیزوزیم در تیمار ٦و ٥ بود. بیشترین ایمونوگلوبین و IgM در تیمارهای ٦ و ٥ مشاهده گردید.
نتیجه گیری: با توجه به نتایج فوق افزودن ٤ میلی گرم اسید فولیک با ۳۰۰ گرم پروبیوتیک در هر تن غذا می تواند در بهبود روند رشد و کارایی غذا نقش مثبتی را ایفا نماید.
واژه های کلیدی: ماهی شیپ، پروبیوتیک باکتوسل، اسیدفولیک، شاخص های خونی ، سیستم ایمنی.

مقدمه
ماهی‌شیپ (Acipenser nudiventris Lovetsky 1828) بیشتر وابسته به آب‌های جنوبی دریای خزر در بخش های رود کورا، ارس و سفید رود می باشد (۲). در دریای خزر کمترین تعداد را در بین همه گونه‌های اقتصادی ماهیان مهاجر خاویاری دارد و حدوداً ۱ درصد از کل صید ماهیان خاویاری در دریای خزر را شامل می شود (۲۳). ماهی شیپ دارای پوزه نسبتاً کوتاه اما تیز به طور تقریب مشابه مقطع یک مخروط می باشد. قسمت فوقانی سر به صورت یک خط مستقیم دیده می شود. لب پایین یک‌پارچه بوده و فاقد شکاف است. سیمبیک ها منشعب و استوانه ای شکل می-باشند(۲۷). همزمان با افزایش رشد جمعیت، صنعت آبزی پروری نیز اهمیت زیادی یافته است وامروزه هزاران مرکز کوچک و بزرگ تکثیرو پرورش انواع ماهی در دنیا و هم چنین در بخش های مختلف کشور فعال می باشد. صنعت آبزی پروری علیرغم این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از عمده مشکلات ابتلا به بیماری در ماهیان و میگوهای

پرورشی به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس‌زا می باشد(۱۱). استفاده از پروبیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی پروری همگام با محیط زیست به شمار می‌رود. با استفاده از این مواد هم می توان تولید را افزایش داد، هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم این‌که آن ها را به عنوان مبارزه بیولوژیک مد نظر قرار داد (۴). در جیره غذایی ماهیان ۱۱ نوع ویتامین محلول در آب و ۴ نوع ویتامین محلول در چربی به کار می رود. مواد غذایی طبیعی در تراکم‌های پایین و شرایط پرورش غیر متراکم امکان دارد بتوانند نسبت‌های مناسب و یا تمامی ویتامین‌های موردنیاز ماهیان را فراهم سازند. اما در تراکم‌های بالای پرورش که مواد غذایی طبیعی فقط برای حفظ حیات جمعیت کفایت می کنند، افزودن ویتامین به جیره غذایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌گردد (۱۵). در تغذیه ماهیان ویتامین اسید فولیک نقش مهمی در ارتقای روند رشد و سلامت ماهی دارد. اسید فولیک برای شکل‌گیری طبیعی گلبول‌های قرمز خون ضروری است. هم‌چنین این ویتامین در مکانیسم های انتقال تک کربنه مانند متابولیسم اسیدهای آمینه و بیوسنتز پورین‌ها و پیریمیدن‌ها دخیل است. کمبود این ویتامین در ماهی موجب کاهش اشتها در رشد، پریشانی، شکنندگی باله-ها، کم خونی، تجمع رنگدانه‌های سیاه در پوست، خون مردگی در طحال و کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می-گردد(۲). توانایی افزایش پاسخ‌های ایمنی و بازماندگی آبزیان با استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی نیز توسط برخی محققین بررسی شده که برخی از آن ها به‌شرح ذیل اشاره می گردد: Rengpipat و همکاران (۲۰۰۰) در یک آزمایش نود روزه، میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) را در دو گروه، یکی با پروبیوتیک *Bacillus* S11 و دیگری بدون پروبیوتیک تغذیه نمودند و مشاهده کردند که فعالیت ضد باکتریایی در گروه پروبیوتیکی بالاتر می باشد(۲۴). بعد از پایان دوره تغذیه نود روزه، میگوها در معرض باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* قرار گرفتند. پس از ده روز، میگوهای تیمار پروبیوتیکی بازماندگی بالاتری (۵۳٪) در مقایسه با گروه شاهد (۳۵/۵٪) نشان دادند، که در سطح P≤ ۰/۰۵ معنی دار بود. تحقیقات Gullian و همکاران (۲۰۰۴) بر روی *Penaeus vannamei* نشان می دهد که استفاده از پروبیوتیک های باکتریایی شامل *Vibrio* و *Bacillus* در تغذیه این میگو نه تنها منجر به افزایش رشد در آن ها می گردد، بلکه در تقویت سیستم ایمنی آن ها نیز نقش عمده ای را دارا می باشد(۱۴). Shiau وHuang (۲۰۰۱) رژیم غذایی اسید فولیک مورد نیاز برای حداکثر رشد بچه ماهی هیبرید تیلاپیای *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* با وزن متوسط اولیه(g ۰/۰۱±۰/۴۱) در مدت زمان ۸ هفته و با سطوح (۰/۰، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۰، ۳/۰، ۶/۰، ۱۰/۰ و ۲۰/۰ mg/kg) اسید فولیک اندازه گیری کردند، نتایج به‌دست آمده نشان داد که افزایش وزن و بازده غذایی در ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی≥۱/۰ میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم غذا به طور معنی داری بیشتر از ماهیان تغذیه شده با۰/۳ میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم غذا و ماهیان شاهد بود(۲۹). آن ها اسید فولیک مورد نیاز رژیم غذایی میگوی *Penaeus monodon* را اندازه گیری کردند و نتایج مشابه را به دست آوردند(۲۸).

مواد و روش ها

مطالعه و اجرای این تحقیق در موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان تاسماهیان دریای خزر واقع در ۲۵ کیلومتری شهر رشت و در مجاورت سد سنگر در جوار رودخانه سفید رود در بخش آبزی پروری از مهر ماه تا دی ماه ۱۳۹۱ انجام گردید. در این تحقیق ۲۱ وان ۵۰ لیتری طراحی و اجرا شد. تعداد ۲۱۰ عدد بچه ماهی

شیپ (*Acipenser nudiventris*) پس از زیست سنجی (اندازه گیری وزن، طول) و تعیین بیومس (زیست توده) با میانگین وزنی ۱/۵۳± ۱۲/۸۴ گرم انتخاب و با تراکم ۱۰ عدد در هر وان کشت شدند. در ۷ تیمارغذایی به ترتیب شامل تیمار۱(۴ میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم جیره)، تیمار ۲(پروبیوتیک ۳۰۰ گرم در هر تن غذا)، تیمار۳ (اسیدفولیک ۴ میلی گرم، پروبیوتیک ۲۰۰ گرم)، تیمار۴(اسیدفولیک ۲ میلی‌گرم پروبیوتیک ۳۰۰ گرم)، تیمار۵(اسید فولیک ۲ میلی‌گرم پروبیوتیک ۲۰۰)، تیمار۶ (اسید فولیک ۴ میلی گرم و پروبیوتیک ۳۰۰ گرم) و تیمار ۷(کنترل) در ۳ تکرار به مدت ۸ هفته تغذیه شدند (۲۱). طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گردید.

جیره‌های غذایی و نحوه تهیه آن

به منظور تهیه جیره‌های غذایی، ابتدا ترکیبات غذایی مورد نیاز جهت آنالیز به آزمایشگاه (آزمایشگاه آنالیز غذایی مرکز تحقیقات و علوم دامی کشور و انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری) منتقل گردید تا بر اساس اطلاعات صحیح از ترکیب مواد اولیه نسبت به تنظیم جیره‌ها اقدام گردد(جدول ۱). با استفاده از پودر ماهی کیلکا عمل‌آوری شده در دمای پائین به‌عنوان منبع پروتئینی، روغن ذرت و روغن ماهی کیلکا (به نسبت مساوی) به‌عنوان منبع چربی و آرد گندم به‌عنوان منبع کربوهیدرات، هفت جیره حاوی سطوح یکسان پروتئین (۴۵٪)، چربی (۱۴٪)، خاکستر (۶/۳٪) با نسبت P/E (۲۲/۱۴میلی‌گرم پروتئین در کیلو ژول) فرموله شدند (۱۰). پس از تنظیم و تعیین درصد هر یک از اجزای سازنده جیره‌ها، اقدام به ترکیب و آماده سازی آن ها توسط دستگاه پلت‌زن CPM گردید. پلت‌ها به قطر ۲ میلی‌متر تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به منظور کاهش دما به میزان ۹ تا ۱۰٪ قرار داده شدند. جیره‌ها پس از خشک‌شدن، بسته بندی، شماره‌گذاری شده و تا زمان مصرف در داخل یخچال نگهداری شدند. پروبیوتیک باکتوسل به نسبت های ۳۰۰،۲۰۰ گرم به ازاء هرتن خوراک و اسید فولیک به نسبت های ۲و ۴ میلی گرم در هر کیلوگرم با غذا مخلوط شدند. یک ساعت قبل از مصرف و توزیع غذا، جیره‌ها از یخچال خارج و پس از متعادل شدن با دمای اتاق با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و در اختیار ماهیان قرار گرفته شدند. اسید فولیک، ساخت شرکت Dae jung chemical. Korea با خلوص ۹۶ درصد، پروبیوتیک Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) محصول شرکت Lallemand .

نحوه غذادهی و زیست سنجی

بچه ماهیان به مدت ۸ هفته با جیره های غذایی آزمایشی شامل تیمار۱(۴ میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم جیره)، تیمار ۲(پروبیوتیک ۳۰۰ گرم در هر تن غذا)، تیمار ۳(اسیدفولیک ۴ میلی گرم، پروبیوتیک ۲۰۰ گرم)، تیمار۴(اسیدفولیک ۲ میلی‌گرم پروبیوتیک ۳۰۰ گرم)، تیمار۵(اسید فولیک ۲ میلی گرم پروبیوتیک ۲۰۰)، تیمار۶(اسید فولیک ۴ میلی گرم و پروبیوتیک ۳۰۰ گرم) در ۳ تکرارو ۲ نوبت (۹ صبح و ۱۵ عصر) تغذیه و زیست‌توده ماهیان هر ۲ هفته یک‌بار وهم چنین انتهای دوره پرورش با ترازوی دقت ۰/۱ گرم توزین شدند(۲۳، ۳). متوسط طول کل ماهیان با متر پارچه ای اندازه گیری شد. قبل از انجام مراحل زیست سنجی، بچه ماهیان به مدت ۱۸ ساعت گرسنه نگه داشته شدند تا میزان استرس ماهیان به حداقل کاهش یابد (۱۰، ۱). بعد از طی دوره پرورش (۸ هفته) و ۲۴ ساعت بعد از آخرین بیومتری ۳۰ درصد از جمعت ماهیان در هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و با سرنگ ۳سی سی از ساقه دمی نمونه خون تهیه و جهت

اندازه گیری شاخص‌های خونی(گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت) و فاکتورهای ایمنی (لیزوزیم، ایمونوگلوبین کل و IgM) به آزمایشگاه ارسال گردید. لازم به ذکر است در هنگام خونگیری از مواد بیهوش کننده به علت احتمال تاثیر بر روی سطوح شاخص‌های خونی استفاده نگردید (۳۱).

روش اندازه گیری فاکتورهای خونی و ایمنی

شمارش گلبول-های قرمز (RBC): با استفاده از پیپت ملانژور قرمز، با رقت ۱ به ۲۰۰، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در ۵ خانه مرکزی لام شمارش شده و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب می گردد) شمارش صورت گرفت(۲۰، ۹، ۷).

شمارش گلبول های سفید (WBC) **:** با استفاده از پیپت ملانژور سفید، با رقت ۱ به ۲۰، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در ۴ خانه مخصوص گلبول های سفید شمارش شده در عدد ۵۰ ضرب می گردد) (۲۰، ۹، ۷) شمارش صورت گرفت.

اندازه گیری هماتوکریت (HCT) **: ۲/۳** لوله میکرو هماتوکریت را از خون پرکرده، پس از مسدود نمودن انتهای لوله با خمیر هماتوکریت، لوله را با سانتریفیوژ با دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و با خط کش مخصوص، میزان آن برحسب درصد قرائت می گردد (۲۱).

اندازه گیری هموگلوبین (Hb) **:** اندازه گیری آن به روش سیان مت یا سیانید هموگلوبین و با اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۰nm بر حسب گرم در دسی لیتر انجام شد (۲۰، ۹، ۷).

اندازه گیری ایمونوگلوبین M (IgM) **:** با استفاده از روش Immunoturbidimetric، IgM موجود در سرم خون با آنتی بادی های پلی کلونال موجود در محلول های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد (۱۹، ۵).

اندازه گیری لیزوزیم: برای اندازه گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، ۵۷/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار۰/۳۷۵میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۶۲) با ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف سنجی وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد (۱۳).

اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبین کل : ۱ میلی لیتر از هر نمونه سرم با ۰/۱ میلی لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول ۳۲٪ مخلوط و به ۲ ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمونوگلوبین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبین توسط سانتریفیوژ در۵۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتی گراد برداشته شد. پروتئین کل در مایع شناور اندازه گیری، مقدار ایمونوگلوبین به-صورت(میلی گرم در هر میلی لیتر) بیان گردید (۳۲، ۳۰).

تحلیل آماری

برای رسم نمودارها از برنامه Excel و جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS استفاده گردید. به-طوری‌که با توجه به نرمال بودن داده‌ها (آزمون Shapiro-wilk)آزمون های تجزیه واریانس یک طرفه (Oneway ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ و دانکن (Duncan) به‌کارگرفته شدند و در مواقعی که داده ها نرمال نبودند، از آزمون ناپارامتری کروسکال – والیس (Kruskal-Wallis) جهت مقایسه تیمارها، و از آزمون

من– ویتنی (Mann-Whitney) برای مقایسه جفتی بین تیمارها استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب غذایی و آنالیز تقریبی جیره شاهد

آرد ماهی	۳۵٤
پودر گوشت	۸٦
مخمر	۱۰۰
گلوتن گندم	۵۰
آرد گندم	۲۰۰
نمک	۱۰
ویتامین پرمیکس	۲۰
پرمیکس معدنی	۱۰
متیونین + سیستئین	۱۵
لایزین	۱۵
ملاس	۲۰
روغن ماهی	٦۵
ماده خشک (گرم در کیلوگرم)	۸۷٤
پروتئین	۳۹۷
چربی	۹۰
خاکستر	۵۵/۲
انرژی ناخالص (مگاژول در کیلوگرم جیره)	۱۸/۹۷
نسبت پروتئین به انرژی (میلیگرم در کیلوژول)	۲۱/۳۸

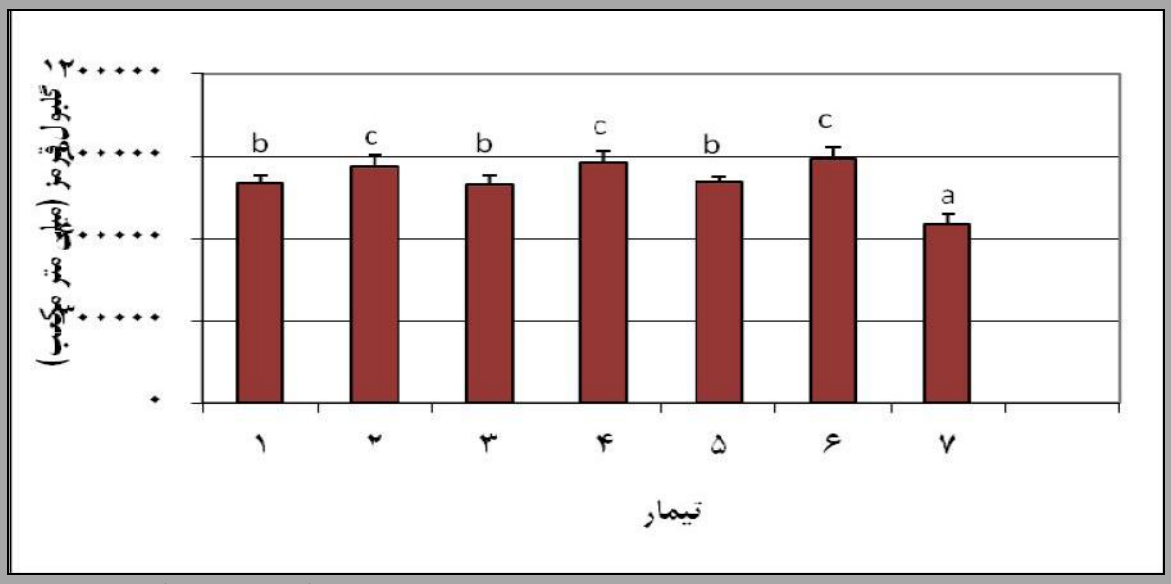
نتایج

با توجه به اهمیت فاکتورهای محیطی از جمله اکسیژن محلول، دما و pH و تاثیر آن ها بر تغذیه و در نهایت رشد ماهیان، این فاکتورها در تمام مدت پرورش به‌طور روزانه کنترل گردید نتایج پارامترهای کیفی آب هیچ-گونه اختلاف معنی‌داری را در طول دوره پرورش نسبت به یکدیگر نشان نداد ($P \geq ۰/۰۵$) (جدول۲). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سطح ویتامین اسید فولیک و پروبیوتیک در تیمارها شاخص‌های خونی اندازه گیری شده به‌طور معنی داری افزایش یافت. ماهیان تغذیه شده از جیره شامل ۴ میلی‌گرم اسید فولیک + ۳۰۰ میلی گرم پروبیوتیک دارای بیشترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت به ترتیب با مقادیر (۴۳۷۶۰/۷ ± ۸۹۰۵۰۰ میلی متر مکعب)، (۲۰۳۰/۴ ±۱۳۱۷۵ میلی متر مکعب)، (۰/۳ ± ۷/۴۷ گرم در دسی لیتر)، (۱/۲۶ ± ۳۷/۷۵ درصد) دارا بودند که بر اساس آزمون کروسکال – والیس اختلاف معنی داری مشاهده شد($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه گیری شده در طول مدت پرورش

مقاطع زمانی / فاکتورها	دوره پرورش با غذای کنسانتره								
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	میانگین
میانگین دمای آب (درجه سانتی گراد)	۲۱/۷	۲۰/٥	۲۰/۳	۱۹/۲	۱۸/۷	۱٦/٤	۱٥/۳	۱٥	۱۸/۳۹
میانگین اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	۷/۸	۸	۸/۱	۸/۳	۸/۱	۷/۹	۷/۳	۷	۷/۸
pH	۷/۳	۷/۳	۷/٤	۷/٤	٦/۳	۷	۷/۲	٦/۹	۷/۱

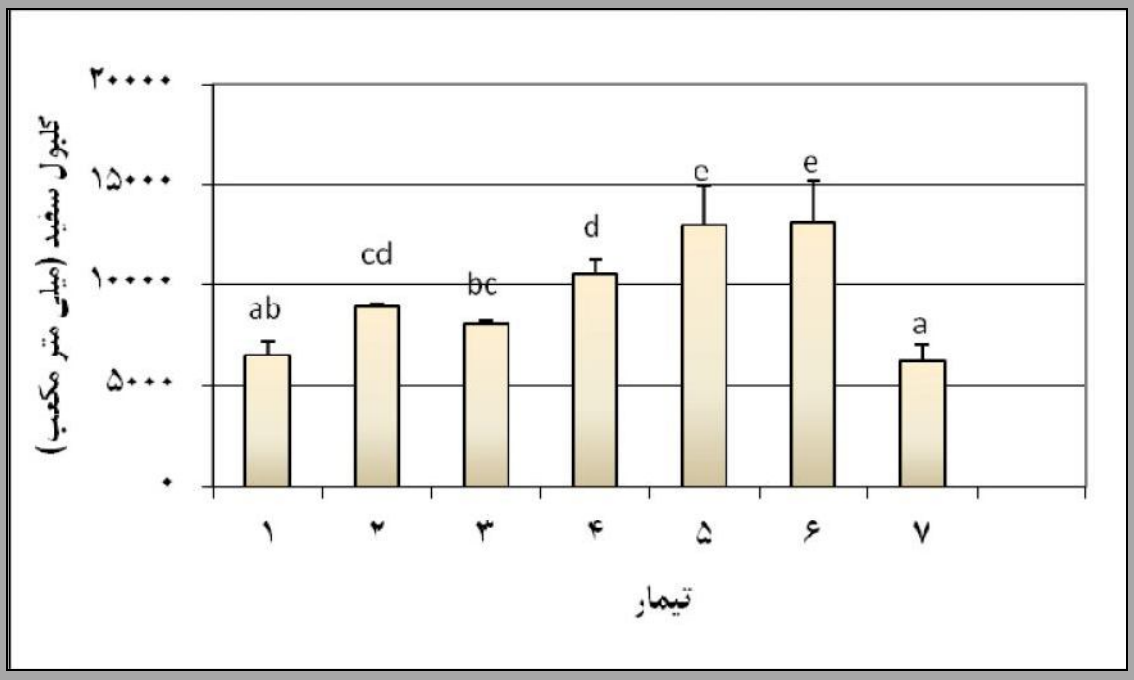
هم چنین میزان نوتروفیل، مونوسیت، به ترتیب با مقادیر(۱/۷۱ ± ۳۶/۷۵ درصد)، (۰/۵۸ ± ۴/۵ درصد) دارای اختلاف معنی دار آماری بود($P<0/05$). میزان ائوزینوفیل، MCHC، MCH در تیمارها دارای اختلاف معنی دار آماری نبود ($P\geq0/05$). نتایج این بررسی نشان داد که فاکتورهای ایمنی اندازه گیری شده نظیر فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبین M و ایمونوگلوبین کل در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی(فولیک اسید ۴ میلی گرم+ پروبیوتیک ۳۰۰گرم در هر تن غذا) از مقادیر بیشتری برخوردار بودند، اختلاف معنی دار آماری در آن مشاهده شد ($P<0/05$)(نمودار ۱-۱۱).



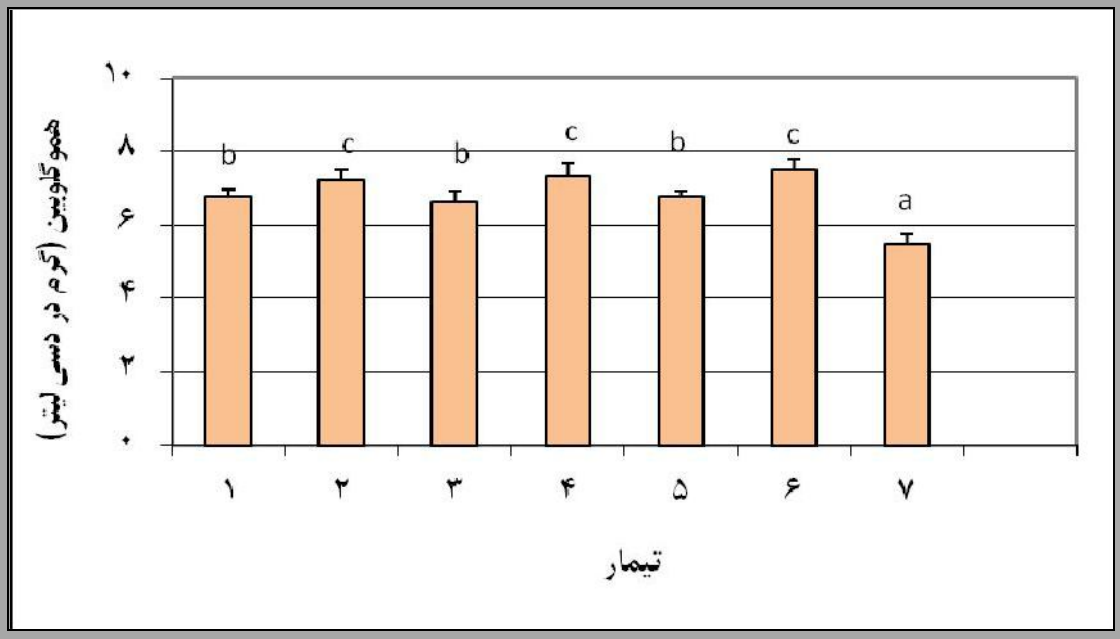
نمودار۱- میانگین تغییرات گلبول‌های قرمز سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی متر مکعب)

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک و اسید فولیک به جیره های آزمایشی منجر به افزایش تعداد کل گلبول های سفید خون در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. تاکنون در خصوص تاثیر پروبیوتیک‌ها بر تعداد گلبول‌های سفید در این نوع باکتری‌ها مطالعه‌ای انجام نشده است، با این‌که بیان شده که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی بادی ها در ارتباط است (۱۷).



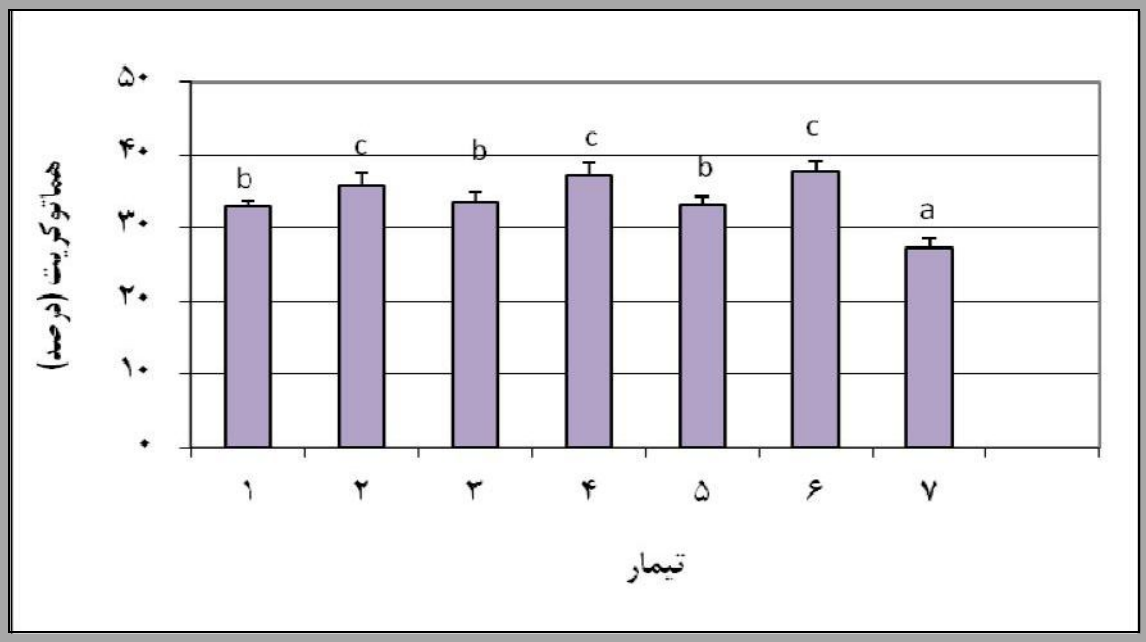
نمودار۲- میانگین تغییرات گلبولهای سفید سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی متر مکعب)



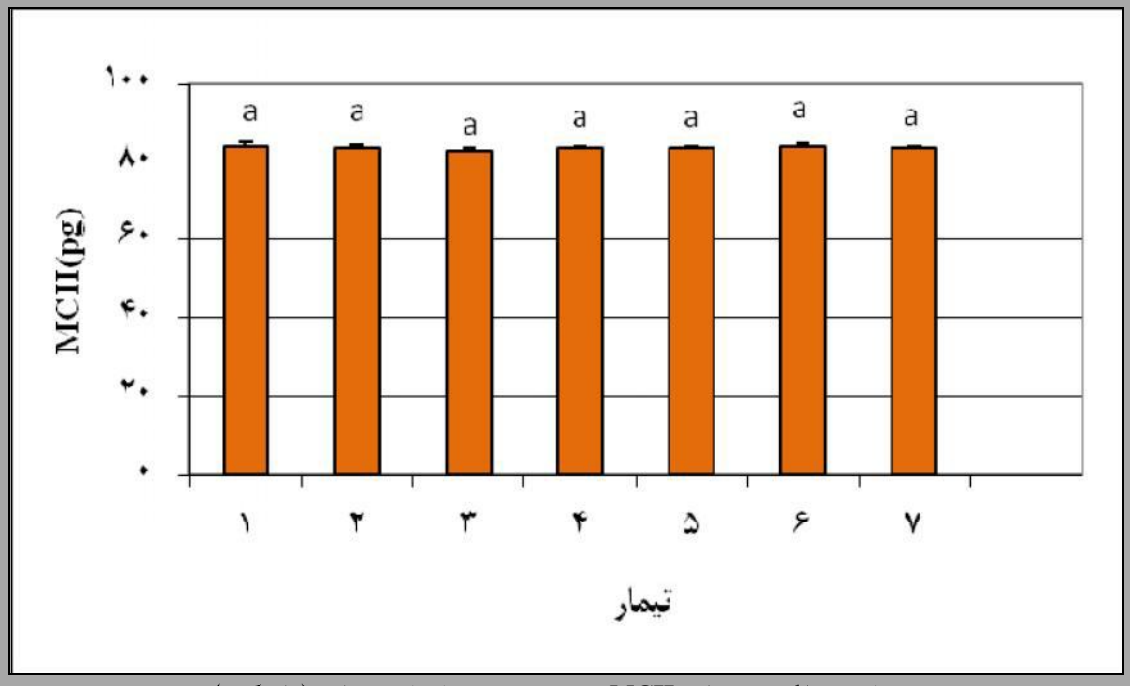
نمودار۳- میانگین تغییرات هموگلوبین سرم خون در تیمارهای مختلف (گرم در دسی لیتر)

برخی عوامل سلولی از قبیل فاگوسیتوزیس گلبول های سفید (۱۸) و فعالیت لنفوسیت ها (۳۰، ۱۸) نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی ها ایفا می نمایند. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبول های سفید انسان توسط باکتری های اسید لاکتیک موجود است (۲۶، ۲۲، ۱۲). مطالعات Irianto & Austin (۲۰۰۲) این نظریه را که تحریک سلولی (یعنی افزایش لنفوسیت های گلبول سفید و کل تعداد ماکروفاژها و افزایش بیگانه خواری) اهمیت ایمنی هومورال را بیشتر تایید می کند (۱۶)، هم چنین Brunt & Austin (۲۰۰۵) نشان دادند که ماکروفاژهای تیمار پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد برای نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین

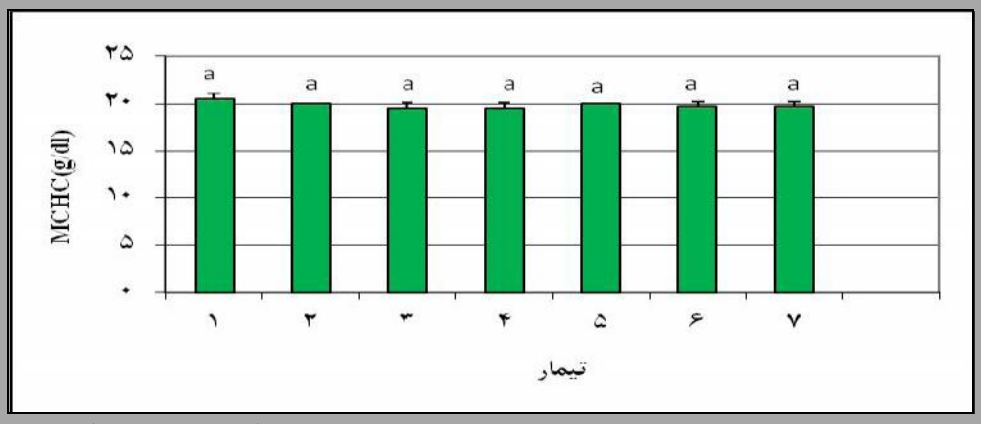
نیز مطابقت دارد. در مطالعه حاضر درصد تعداد گلبول قرمز در تیمار ۶، ۴ و ۲ اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد نشان داد،که تاثیر پروبیوتیک در بهبود اکسیژن رسانی به بافت ها و فرآیند سوخت و ساز و انتقالCO_2 از بافت ها به بیرون بدن می باشد (۸). از آن‌جایی که هموگلوبین پروتئینی است که ۹۵ درصد گلبول قرمز را تشکیل می دهد، نتایج هموگلوبین با تعداد گلبول قرمز مطابقت دارد (۳۲). هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد (۳۱). میزان (MCH) و (MCHC) سرم خون در تیمارهای حاوی پری بیوتیک و اسید فولیک نسبت به تیمار شاهد فاقد اختلاف معنی دار بودند (P>۰/۰۵).



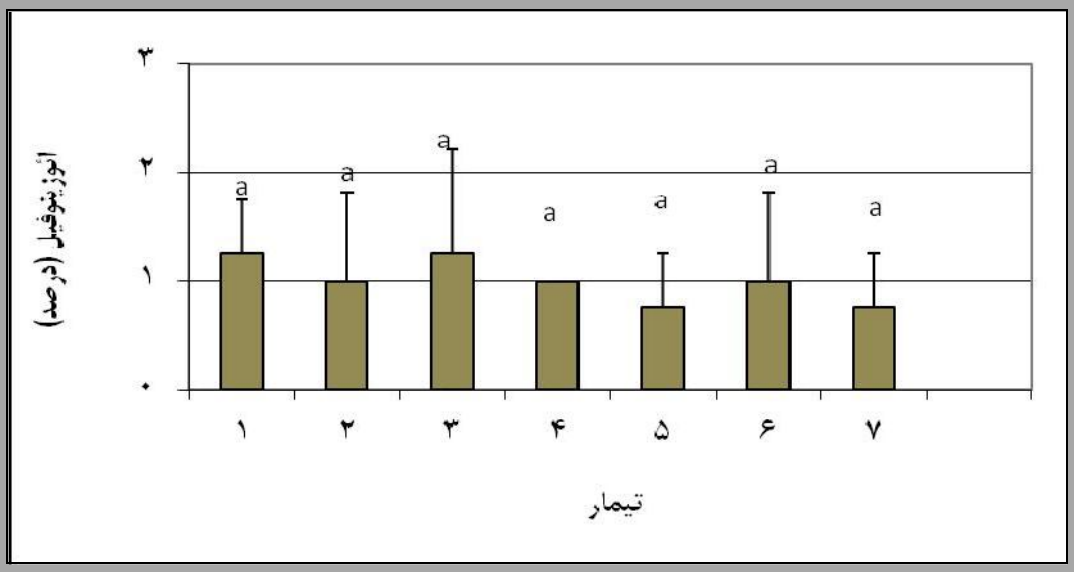
نمودار٤- میانگین تغییرات هماتوکریت سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)



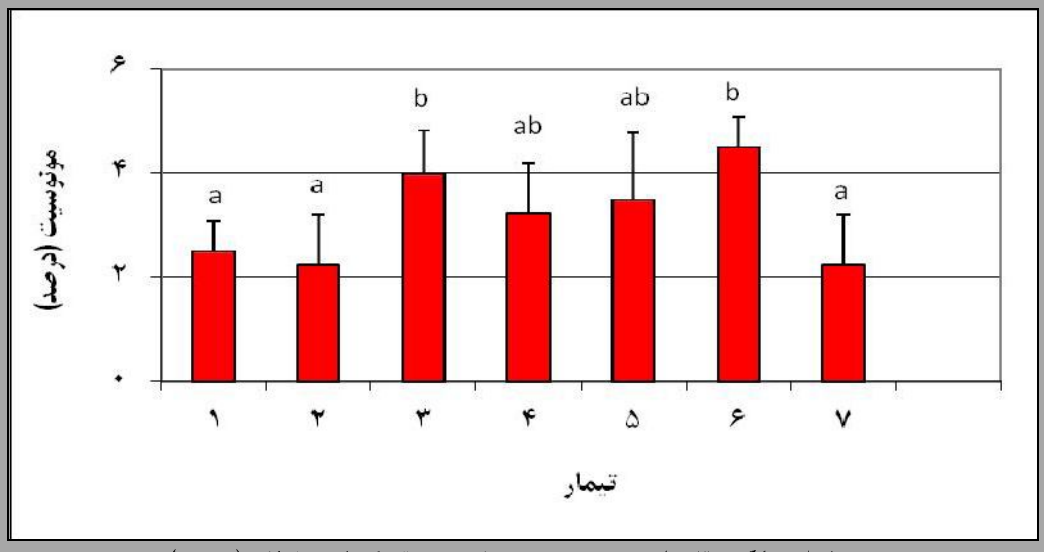
نمودار٥- میانگین تغییرات MCH سرم خون در تیمارهای مختلف (پیکوگرم)



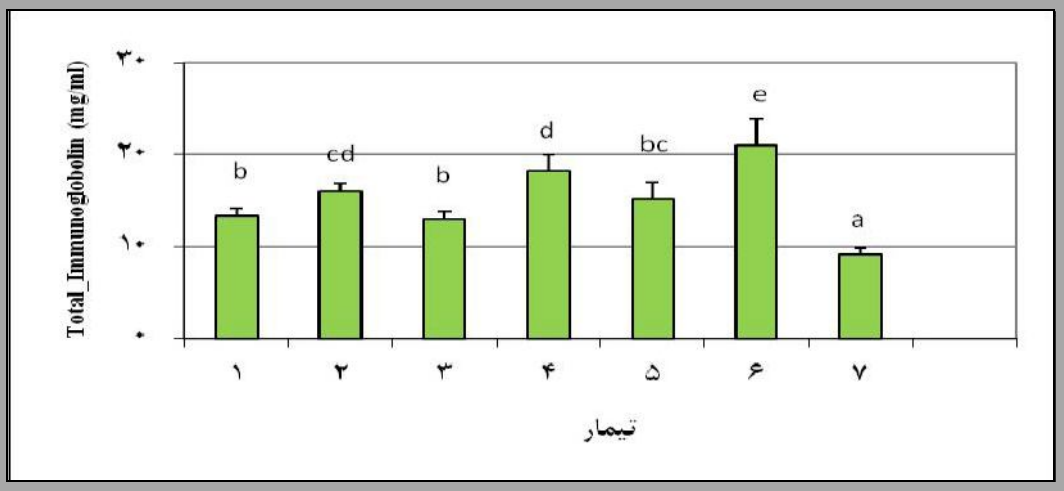
نمودار٦ـ میانگین تغییرات MCHC سرم خون در تیمارهای مختلف (گرم در دسی لیتر)



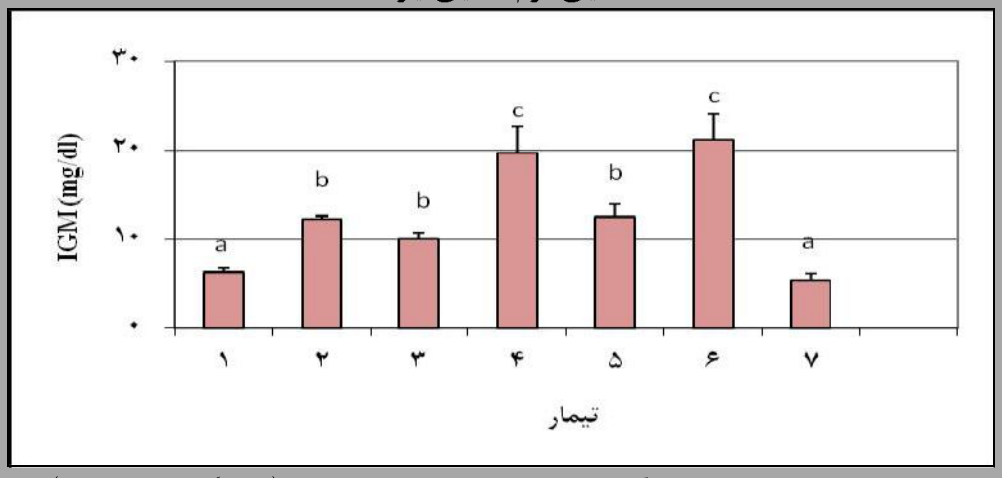
نمودار۷- میانگین تغییرات ائوزینوفیل سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)



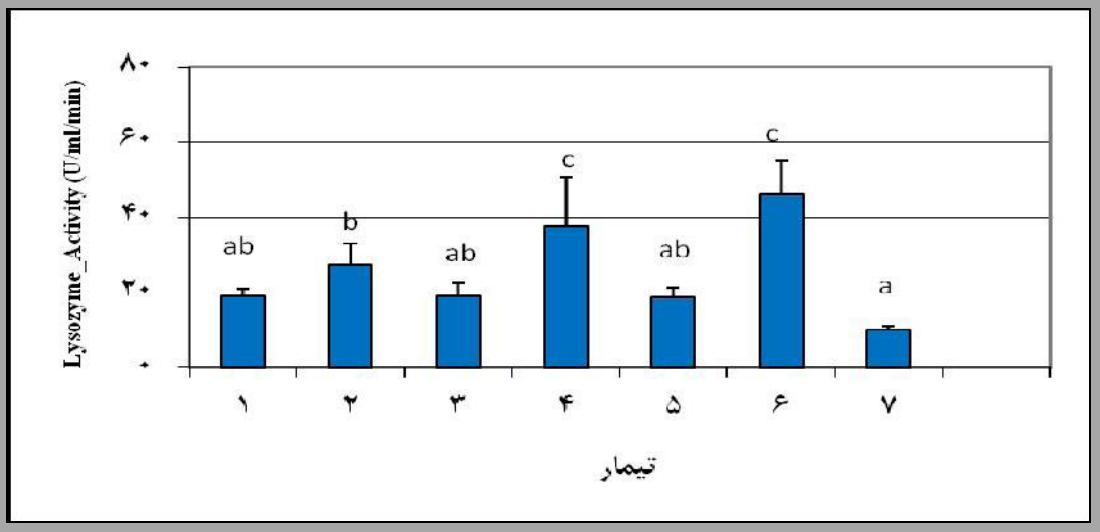
نمودار۸- میانگین تغییرات مونوسیت سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)



نمودار۹- میانگین تغییرات ایمنوگلوبین کل سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی گرم در میلی لیتر)



نمودار۱۰- میانگین تغییرات ایمنوگلوبین سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی گرم در دسی لیتر)



نمودار۱۱- میانگین تغییرات لیزوزیم سرم خون در تیمارهای مختلف (U/ml/min)

اختلاف معنی داری در بین انواع گلبول های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت) به جزء ائوزینوفیل در بین تیمارها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵). ماهیان تغذیه شده با تیمارهای (۶) و(۳) افزایش معنی داری را نسبت به گروه شاهد از نظر تعداد مونوسیت ها نشان دادند. مونوسیت ها مانند گرانولوسیت ها نقش مهمی را در ایمنی غیراختصاصی و پاسخ التهابی دارند و این یافته‌ها نشان داد که نسبت به گرانولوسیت ها بسیار بیگانه خوارترند. عمده ترین فعالیت نوتروفیل ها انجام عمل فاگوسیتوز فعال می باشد (۸) ماهیان تغذیه شده با تیمارهای ترکیبی پروبیوتیک و اسید فولیک دارای تعداد بیشتری از نوتروفیل‌ها در مقایسه با تیمار شاهد بودند که این مقدار در تیمار ۵ بیشتر از سایرین است. حداکثر میزان ایمنوگلوبین کل (Ig) سرم خون مربوط به تیمار ۶ می باشد. طبق نتایج به‌دست آمده میزان لنفوسیت‌ها، ایمونوگلوبین کل Ig و ایمونوگلوبین M (IgM) بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی دار آماری داشت. میزان فعالیت لیزوزیم سرم به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیراختصاصی در ماهی می باشد (۲۵) و افزایش آن پس از مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکان ها و تحریک آنتی ژن افزایش می یابد (۶) میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار۶ و۴افزایش معنی داری را نسبت به شاهد داشته که می توان علت آن را این طور تفسیر کرد که منشائ بیشترین مقدار تولید لیزوزیم از نوتروفیل ها و مونوسیت ها می باشد حال همان‌طور که از نتایج پیداست بیشترین مقدار این یافته های بیگانه خوار در تیمار ۶ بود، هم چنین بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید طبق گزارشاتی بر فعالیت لیزوزیم تاثیرگذار می باشند (۲۴).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله بر خود لازم می دانم از همکاری صمیمانه پرسنل زحمت کش موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان به ویژه همکاران بخش تکثیر و پرورش آن مرکز در اجرای این تحقیق قدردانی نمایم.

منابع

۱–ابراهیمی، ع.، پوررضا، ج.، پاناماریوف، س.، کمالی، الف.، حسینی، ع. ۱۳۸۳. اثر مقادیر مختلف پروتئین وچربی بر شاخص های رشد و ترکیب لاشه بچه ماهیان انگشت قد فیل ماهی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان. سال هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۳. صفحات ۲۲۹ تا ۲۴۱.

۲–افشار مازندران،ن.۱۳۸۱.راهنمای علمی تغذیه و نهاده های غذایی و دارویی آبزیان در ایران.چاپ سما رنگ.چاپ اول.۲۱۶ص.

۳–پور علی، ح.ر.، محسنی، م.، آق تومان، و.، توکلی، م. ۱۳۸۲. پرورش بچه ماهیان با در صدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده. مجله علمی شیلات ایران. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ماهیان خاویاری، صفحات ۳۷ تا ۴۸.

٤–حسینی فر، ح.، میرواقعی، ع.، مجازی، پ.، خوشباور، ح.، پورامینی، م.، درویش بسطامی، ک. ۱۳۸۹. بررسی اثرات پری بیوتیکی مخمر *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoidus* غیرفعال بر برخی شاخص های رشد، مصرف جیره، بازماندگی و میکروبیوتای روده بچه فیل ماهی (*Huso huso*) جمله علمی شیلات ایران. سال نوزدهم، شماره ۴. ۱۲ صفحه.

٥–سقا، ح.ر.، سروش نیا، م. ۱۳۸۲. کتاب جامع تجهیزات و فرآوردهای آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. ۲۶۸۷ صفحه.

٦–سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ 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–مجابی، ع.، حیدر نژاد، الف. ۱۳۸۲. خون شناسی دامپزشکی و روش های آزمایشگاهی. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۲۱۴ صفحه.

۱۰–محسنی، م.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی، ر.، آقتومان، و. ۱۳۸۵. تشکیل و پرورش گله های مولد از مولدین پرورش یافته در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهی، فاز اول: بیوتکنیک پرورش گوشتی فیل ماهی در آب شیرین. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. ۱۳۶ صفحه.

11. Berg, S.L.(1984). Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Jerusalem, 1 (1962) 504-pp.

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

13. Ellis, A.E.(1990). Lysozyme assays. In: Techniques in fish Immunology. Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (eds). SOS Publication, USA,101-103.

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

15. Halver, J. E. (1957). Nutrition of salmonoid fishes. III. Water soluble vitamin requirements of chinook salmon. Journal of Nutrition, 62; 225–243.

16. Irianto, A., Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture: Reviews Journal of Fish Diseases, 25; 633-642.

17. Irianto, A., Robertson, P.A.W., Austin, B. (2000). The use of probiotics in aquaculture :Recent Research and developments in microbiology, 4; 557-567.

18. Jones, S.R.M., Stevenson, R.M.W., Paterson, W.D. (1993). Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen Yersinia ruckeri. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 4; 93–95.

19. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Kazemi, B., Hassan, M.D. (2006b). Purification and partial characterization of serum immunoglobulins from caspian sea sturgeons. Bulletin European Association Fish Pathology, 26; 58-62.

20. Klontz, G.W. (1994). Fish hematology. In: Techniques in fish immunology. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaatari, S.L. and Smith, S.A (eds). Vol. 3. SOS Publications, Fair Hven, New Jersey, USA. pp.121-132.

21. Mohseni, M., Poukazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H.R., Salehpour, M. (2006). Effects of feeing rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon ,*Huso huso* .Journal of Applied Ichthyology, 22; 278-282.

22. Oyetayo, V.O., Oyetayo, F.L. (2005). Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. African Journal of Biotechnology, 4(2); 123-127.

23. Rengpipat, S., Pukpratanporn, S., Piyatitivorakul, S., Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191; 271-288.

24. Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemer, G.I., Bake, A.M. (2010) Prebiotic in aquculture : oreview aquculture nutrition, 16 ; 117 – 136.

25. Sakai , M. (1999). Vurrent research status of fish immunostimultans aquculture. 172 ; 63 – 92.

26. Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F., Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leucocytes in humans by lactic acid bacteria: Criteria for strain selection. American Journalof Clinical Nutrition, 66(2); 515S–520S.

27. Sokolov, L.I., Vasilier, V.P. (1989). *Acipenser nudiventris* Lovetsky, In: J. Holeik (ed). The fresh water fishes of Europe, Vol. 1, part II, General introduction to fishes. Acipenseriformes, AULA – verlag, wewsbaden. 206-226.

28. Shiau, S. Y., Huang, S. Y. (2001a). Dietary folic acid requirement for maximum growth of

juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Fisheries Science, 67; 655–659.
29. Shiau, S. Y., Huang, S. Y. (2001b). Dietary folic acid requirement determined for grass shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 200; 339–347.
30. Siwicki, AK., Anderson, DP. (1993). Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden.
31. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F. (2007). Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish and Shellfish Immunology, 23; 969-981.
32. Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., Klesius, P.H. (2007). Immune response and Edwardsiella ictaluri challenge in channel catfish, *Lctalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents.J.World Aquacult.Soc, 38; 24-30.