Archive of SID

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 8, Issue 2, Spring 2019
Pages: 75-81
Type: Original Research

The Effect of Protexin Probiotic on Some Hematological Parameters of Common Carp Juveniles (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758) before and after Long-Distance Transportation in Plastic Baggage

Jafaryan S.[1] MSc, Jafaryan H.[1] PhD, Bivareh M.*[1] PhD

[1] Fisheries Department, Agriculture & Natural Resource Faculty, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous,

Abstract

Aims: Transportation of live fish is a common practice among aquaculture facilities. Different studies have reported how transport elicits physiological stress responses and increases disease susceptibility in farmed fish. The aim of the present study was to evaluate the hematological parameters in common carp juvenile feeding of Bacillus sp. probiotics in the condition of before and after long-distance transports.

Materials & Methods: In this experimental study, 180 common carp juveniles with a mean weight of 40±1.89g were randomly divided into 2 fiberglass tanks with a capacity of 400L. Fish juveniles in one tank were feeding with Protexin were used at a concentration of 1×10^{7}CFU/100g and fishes in the other tank were not consumed probiotic (control group) for 45 days. At the end of the feeding trial, the carp juveniles from both treatments randomly were packed in plastic bags (40L) at a density of 1kg/bag. The juvenile feeding previously from probiotic were packed in 2 treatments with 0/05g NaCl/or without of NaCl in water. Also, the juvenile feed of the control tank was packed in bags as the control. The bags unpacked after 12h and blood samples were taken from 10 fish in each replicate and hematological parameters were compared among the groups.

Findings: WBC, Hematocrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, and leukocytes differential count are affected by after transport stress ($p<0.05$). However, there were no significant differences in the amounts of RBC and hemoglobin in experimental treatments ($p>0.05$).

Conclusion: Feeding of common carp juveniles with Bacillus sp. probiotics had positive effects on blood parameters before and after long-distance transportation in plastic baggage, thereby if used in diet, it can be good alternatives to salt.

Keywords
Common carp [Not in MeSH];
Transportation [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014186];
Stress [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013315];
Probiotic [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Probiotic];
Salt [Not in MeSH];
Hematological Parameters [Not in MeSH]

*Corresponding Author
Tel: -
Fax: -
Post Address: Fisheries Department, Agriculture & Natural Resource Faculty, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
mohamadrezabivareh@yahoo.com

Received: December 15, 2018 Accepted: February 21, 2019 ePublished: June 20, 2019

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر پروبیوتیک پروتکسین بر برخی از پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) در شرایط قبل و بعد از حمل و نقل‌های طولانی‌مدت در کیسه‌های پلاستیکی

سمیرا جعفریان MSc
گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
حجت‌الله جعفریان PhD
گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
محمدرضا بیواره* MSc
گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

چکیده
اهداف: حمل و نقل زنده ماهی یکی از شیوه‌های مرسوم در فعالیت‌های آبزی‌پروری است. مطالعات مختلف نشان داده است که چگونه این عملیات باعث افزایش پاسخ‌های فیزیولوژیک استرس و قابلیت بروز انواع مختلف بیماری‌ها در ماهیان می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر برخی پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی در شرایط قبل و بعد از حمل و نقل‌های طولانی‌مدت بود.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۱۸۰ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱/۸۹±۴۰گرم به شکل تصادفی در دو مخزن فایبرگلاس با ظرفیت ۴۰۰لیتر تقسیم شدند. در یک مخزن بچه‌ماهیان با جیره‌های تکمیل‌شده توسط پروتوکسین با غلظت ^{۷}۱۰×۱واحد کلنی در ۱۰۰گرم غذا و در مخزن دیگر با جیره‌های فاقد پروبیوتیک (گروه شاهد) به مدت ۴۵ روز غذادهی شدند. در پایان دوره غذادهی، بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از پروبیوتیک در دو تیمار آزمایشی شامل کیسه حاوی ۰/۵گرم سدیم‌کلرید در هر لیتر آب و کیسه فاقد سدیم‌کلرید و بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از گروه شاهد تحت همین عنوان در کیسه‌های پلاستیکی ۴۰لیتری با سطح تراکم یک‌کیلوگرم ماهی بسته‌بندی شدند. پس از ۱۲ساعت، نمونه‌برداری از خون ۱۰ بچه‌ماهی انجام شد و پارامترهای خون‌شناسی مورد سنجش قرار گرفت.
یافته‌ها: استرس ناشی از حمل و نقل باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در سطوح گلبول سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC و شمارش افتراقی لکوسیت‌ها بین تیمارهای مختلف آزمایشی شد ($p<۰/۰۵$)، اما تاثیرات معنی‌داری در سطوح گلبول قرمز و هموگلوبین نداشت ($p>۰/۰۵$).
نتیجه‌گیری: استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در جیره غذایی بچه‌ماهیان کپور معمولی تاثیرات مثبتی بر پارامترهای خونی آنها در شرایط قبل و بعد از حمل و نقل‌های طولانی‌مدت دارد و در صورت استفاده در جیره غذایی می‌تواند جایگزین مناسبی به جای نمک باشد.
کلیدواژه‌ها: کپور معمولی، حمل و نقل، استرس، پروبیوتیک، نمک، پارامترهای خون‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲
*نویسنده مسئول: mohamadrezabivareh@yahoo.com

مقدمه

ماهی کپور معمولی یکی از مهم‌ترین ماهیان تجاری از خانواده کپورماهیان است. با توجه به نرخ رشد سریع و پرورش آسان ماهی کپور این گونه به‌عنوان یکی از پرجمعیت‌ترین ماهیان در حال پرورش در سطح جهان شناخته می‌شود[1]. یکی از چالش‌های عمده در پرورش این گونه بهبود جیره‌های غذایی فرموله‌شده به‌منظور افزایش رشد و ارتقای سلامت است. یکی از روش‌های ایده‌آل برای مقابله با این چالش استفاده از مکمل‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها است که در صورت اضافه‌شدن به جیره باعث بهبود رشد و تاثیرات مفیدی بر سیستم ایمنی میزبان می‌شوند[2].

نقش افزودنی‌های غذایی بر عملکرد سیستم ایمنی ماهیان از دهه ۱۹۸۰ میلادی مورد مطالعه قرار گرفته است[3]. برخی از این مواد افزودنی به‌دلیل داشتن پتانسیل بالا برای محافظت از ماهی در برابر بیماری‌ها و عوامل استرس‌زا مورد بررسی قرار می‌گرفتند[4]. انتقال ماهی یک عملیات چندمرحله‌ای است که بایستی طوری طراحی شود تا علاوه بر کاهش هزینه‌های اقتصادی میزان استرس را نیز به حداقل مقدار ممکن کاهش دهد[5]. درواقع یکی از بزرگترین چالش‌ها در حمل و نقل ماهیان زنده به حداقل‌رساندن میزان استرس در آنها است[6]. همان‌طور که *شرک* و *تورت*[7] نیز بیان داشتند که استرس به‌عنوان جزء اصلی زندگی همه مهره‌داران از جمله ماهیان است. طبق تعریف *فرانسیس‌فلوید*[8] استرس به‌عنوان شرایطی تعریف می‌شود که در آن به‌دلیل تحت تاثیر قرارگرفتن سلامت توسط فاکتورهای مختلف، موجود زنده قادر به حفظ حالت طبیعی خود نیست. استرس در ماهیان می‌تواند به‌دلیل شرایط بیولوژیکی، فیزیکی و یا شیمیایی رخ دهد و باعث ابتلای ماهی به انواع مختلف بیماری‌ها شود[9]. ماهی در حال حمل و نقل عموماً در مدت زمان کوتاهی در معرض چندین نوع عامل استرس‌زا قرار می‌گیرد[6]. استرس‌های بالقوه‌ای که در ارتباط با حمل و نقل زنده ماهی مطرح می‌شود شامل تراکم نامناسب، محدودیت مخزن، دست‌کاری‌های فیزیکی، کیفیت نامناسب آب و عادت‌پذیری ماهی به شرایط جدید هستند[6]. حتی اگر ماهی با دقت نیز منتقل شود، گروهی از عوامل استرس‌زای خفیف ممکن است با هم واکنش دهند و منجر به شروع مرگ و میر شوند[10].

پاسخ به استرس در ماهیان فرآیندی بسیار پیچیده و شامل مجموعه‌ای از واکنش‌های رفتاری و فیزیولوژیکی است که به اشکال جبران‌کننده و یا انطباق‌دهنده تقسیم می‌شوند. این رفتارها، ماهی را قادر به غلبه بر عوامل استرس‌زا می‌کند. پاسخ‌های استرس اولیه در ماهی شامل فعال‌سازی مراکز عالی قشر مخ هستند که منجر به انتشار گسترده کورتیکواستروئیدها، کاته‌کول‌آمین‌ها و فعال‌شدن تعدادی از پاسخ‌های استرس ثانویه در تمام سطوح درونی و بیرونی بدن می‌شوند[11].

برای انتقال ماهی زنده از مواد شیمیایی مختلفی استفاده می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

با چند استثنا، شواهد کمی در خصوص مزایای استفاده از این مواد شیمیایی در روش‌های مختلف حمل و نقل وجود دارد[12]. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که بیهوشی می‌تواند پاسخ‌های استرسی مشابه با دست‌کاری ایجاد کند[12]. با این حال این روش برای آرام‌کردن ماهیان تحریک‌پذیر که ممکن است در طول حمل و نقل آسیب ببینند بسیار مفید خواهد بود. در حال حاضر تنها ماده افزودنی توصیه‌شده برای انتقال ماهی، نمک‌های غذایی هستند و کلریدسدیم شایع‌ترین آنها است. از سایر نمک‌های زیستی مانند سدیم‌بی‌کربنات و سولفات‌کلسیم نیز در این رابطه می‌توان استفاده کرد[12]. اضافه‌کردن نمک در سطوح مناسب به آب باعث ایجاد شوری در سطحی مشابه با شوری خون ماهی، کاهش گرادیان یونی[13] و پاسخ‌های متابولیکی و هورمونی مناسب می‌شود[14].

با توجه به موارد ذکرشده در مطالعه حاضر تاثیر تغذیه از باسیلوس‌های پروبیوتیکی همراه با افزودن نمک به کیسه‌های حمل و نقل بر برخی از پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با بچه‌ماهیانی که در کیسه‌های فاقد نمک منتقل شده بودند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام مطالعه حاضر تعداد ۱۸۰ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱/۸۹±۴۰گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهید چمران (گلستان) تهیه و به آزمایشگاه آبزی‌پروری دانشگاه گنبد کاووس منتقل شد. سپس بچه‌ماهیان برای سازگاری با شرایط جدید به مدت یک هفته در مخزن ۲۰۰۰لیتری موجود در محل آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول دوره سازگاری بچه‌ماهیان با جیره پایه مخصوص ماهی کپور (فرادانه؛ ایران) با قطر ۳میلی‌متر و ترکیبات تقریبی ۳۸% پروتئین خام، ۸% چربی خام، ۷% فیبر خام، ۱۱% خاکستر، ۱۱% رطوبت و ۱/۵% فسفر غذادهی شدند.

پس از پایان دوره سازگاری و انجام زیست‌سنجی اولیه، بچه‌ماهیان به شکل تصادفی در دو مخزن فایبرگلاس با ظرفیت ٤۰۰لیتر با تراکم ۹۰ بچه‌ماهی در هر مخزن تقسیم شدند. در طول دوره پرورش، آب به‌صورت غیر چرخشی و به‌طور دایم هوادهی شد. دوره نوری درنظرگرفته‌شده به‌صورت ١٦ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی بود. تغذیه بچه‌ماهیان روزانه در ۳ نوبت در ساعات ۸:۰۰، ١٤:۰۰ و ۲۰:۰۰) معادل ۵% وزن بدن با استفاده از جیره پایه تکمیل‌شده با مخلوط اسپور پنج سویه از باکتری‌های جنس باسیلوس شامل *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*)، *باسیلوس پلی‌میکسا* (*B. Polymyxa*)، *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* (*B. licheniformis*) ، *باسیلوس سیرکولانس* (*B. circulans*) و *باسیلوس لاتروسپوروس* (*B. laterosporus*) با غلظت ۱×۱۰^۷ واحد کلنی در ۱۰۰گرم غذا تحت عنوان تجاری پروتکسین آکواتک (نیکوتک؛ ایران) به مدت ۴۵ روز انجام شد. برای آماده‌سازی غلظت مورد نظر، ابتدا مقدار ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی مخلوط اسپور باکتریایی برداشته و در پلیت‌های حاوی محیط کشت ژلاتینی تریپتیک آگار (TSA) استریل‌شده، کشت داده شد. پلیت‌های کشت‌داده‌شده در دستگاه انکوباتور به مدت ٢٤ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، با استفاده از آنس استریل پرگنه‌های تشکیل‌شده از پلیت‌های کشت جداسازی و به اپندروف‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شدند. با استفاده از همزن برقی در مدت ۵دقیقه محلولی هموژن از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شد. سپس غلظت باکتریایی مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل بیوکروم S11 و محلول استاندارد نیم مک‌فارلند، غلظت نوری باکتریایی مورد نظر بر مبنای واحد تشکیل کلنی (CFU) بر لیتر براساس چگالی بهینه در طول‌موج ۶۱۰نانومتر تعیین شد[15, 16].

برای تکمیل جیره‌های غذایی، سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده در غلظت ۱×۱۰^۷واحد کلنی بر لیتر به ۲۰میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و با افشانه روی ۱۰۰گرم غذا اسپری شد. جیره تکمیل‌شده به‌خوبی هم زده و پس از یکنواخت‌شدن، در دستگاه انکوباتور با دمای ۴۰°C به مدت ۵ساعت خشک و از الک‌های ریزچشمه مطابق با سایز دهان بچه‌ماهیان عبور داده شد[17]. ساخت جیره مورد استفاده برای گروه شاهد نیز طی فرآیند مذکور اما بدون استفاده از هر گونه ماده افزودنی انجام شد. جیره‌های غذایی به‌صورت هفتگی تهیه و تا زمان استفاده در دمای ٤°C ذخیره می‌شد.

پس از پایان دوره غذادهی (٤۵ روز)، برای بررسی تاثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی طی حمل و نقل‌های طولانی‌مدت از کیسه‌های پلاستیکی با حجم ٤۰لیتر در دو تیمار آزمایشی به همراه یک گروه شاهد هر کدام با ۳ تکرار استفاده شد. کیسه‌ها با حجم ۲۰لیتر آب شیرین و ۲۰لیتر هوای فشرده پر شدند. درب آنها با استفاده از طناب نایلونی مسدود شد و بچه‌ماهیان در شرایط مذکور به مدت ۱۲ساعت نگهداری شدند. هر کیسه حاوی یک‌کیلوگرم بچه‌ماهی بود.

در تیمار اول از بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی، در تیمار دوم از ۰/۵گرم نمک سدیم‌کلرید در هر لیتر آب حاوی بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی و در تیمار سوم فقط از بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از جیره پایه بدون هر گونه ماده افزودنی استفاده شد. در طول دوره حمل و نقل دمای آب کیسه‌ها در سطحی ثابت و معادل ۲۵°C بود.

بچه‌ماهیان در دو مقطع زمانی مختلف شامل بلافاصله بعد از صید و پایان دوره ۱۲ساعته حمل و نقل از طریق ورید ساقه دمی خون‌گیری شدند. در هنگام خون‌گیری به‌دلیل احتمال ایجاد شرایط نامناسب و استرس‌زا و تاثیر آن بر شاخص‌های خونی از مواد بیهوش‌کننده استفاده نشد[18]. برای خون‌گیری ۱۰ عدد بچه‌ماهی از هر کیسه (تکرار) با میانگین وزنی ۱/۲۹±۵۵گرم به‌طور تصادفی صید شدند و به‌آرامی درون پارچه‌ای مرطوب قرار گرفتند. چشم و سرپوش آبششی آنها به‌طور کامل پوشانده شدند. پس از آرام‌گرفتن ماهی با استفاده از سرنگ‌های ۲میلی‌لیتری نسبت به خون‌گیری آنها از طریق

www.SID.ir

Archive of SID

ورید ساقه دمی اقدام شد. مقدار ۰/۵میلی‌لیتر خون تازه از هر نمونه ماهی گرفته و به لوله‌های اپندورف حاوی ماده ضدانعقاد هپارین (۱۰میکرولیتر به ازای هر ۰/۵میلی‌لیتر خون) منتقل شد.

تعداد گلبول‌های سفید و قرمز مطابق روش *بلکسهال* و *دایزلی*[19] با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار، درصد هماتوکریت مطابق روش *ونگلند* و همکاران[20] به روش استاندارد میکروهماتوکریت، غلظت هموگلوبین مطابق روش *بلکسهال* و *دایزلی*[19] به روش سیان‌مت هموگلوبین و اندازه‌گیری ضرایب گلبولی شامل حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) از طریق فرمول‌های مربوطه اندازه‌گیری شد[19]. به‌منظور شمارش تفریقی گلبول‌های سفید شامل نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت‌ها نیز گسترش خونی روی لام‌های شیشه‌ای معمولی تهیه شد و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی و نتایج بر حسب درصد گزارش شدند[21].

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{هماتوکریت (\%)}}{\text{گلبول قرمز(میلی‌مترمکعب/}10^6\times)} \times 10$$

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)}}{\text{گلبول قرمز(میلی‌مترمکعب/}10^6\times)} \times 10$$

$$\text{MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)} = \frac{\text{هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)}}{\text{هماتوکریت (\%)}} \times 10$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 25 انجام شد. ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون مورد سنجش قرار گرفت. پس از کسب اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و به‌منظور جداسازی گروه‌های همگن از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵% استفاده شد. برای تعیین ارتباط بین پارامترهای اندازه‌گیری‌شده ضریب همبستگی پیرسون نیز محاسبه شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی پس از ۱۲ساعت حمل و نقل در جدول ۱ ارایه شده است. براساس نتایج حاصل تعداد گلبول‌های سفید هم در حالت آرامش و هم پس از حمل و نقل در تیمارهای تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$)، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی حاوی نمک و فاقد نمک مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). بیشترین تعداد گلبول سفید در خون بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در حالت آرامش و کمترین تعداد آن در خون بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد ثبت شد.

درصد هماتوکریت هم در حالت آرامش و هم پس از حمل و نقل در تیمارهای تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه‌های شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیشترین درصد هماتوکریت در خون بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد و کمترین درصد آن در تیمار تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی به همراه نمک و فاقد این ماده افزودنی ثبت شد.

اندیس‌های گلبولی پس از حمل و نقل کاهش معنی‌داری در خون بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار برای هر سه شاخص در خون بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد، کمترین مقدار MCV و MCH در خون بچه‌ماهیان حمل‌شده در تیمار تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی به همراه نمک و کمترین مقدار MCHC نیز در خون بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در تیمار فاقد نمک ثبت شد. بررسی این شاخص‌ها در حالت آرامش نیز نشان داد که از بین ضرایب گلبولی فقط میزان MCHC در خون بچه‌ماهیان تغذیه‌کرده از باسیلوس های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد به شکل معنی‌داری کاهش یافته است ($p<۰/۰۵$). برای دو شاخص دیگر این نتایج فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p>۰/۰۵$).

درصد لنفوسیت‌ها در هر دو شرایط قبل و بعد از حمل و نقل در تیمارهای تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیشترین درصد لنفوسیت در تیمار تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی به همراه نمک و کمترین درصد آن در بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد ثبت شد.

درصد نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در هر دو شرایط قبل و بعد از حمل و نقل در تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه‌های شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). بیشترین درصد نوتروفیل و ائوزینوفیل در خون بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد و کمترین درصد آنها در تیمار حاوی نمک ثبت شد.

درصد مونوسیت‌ها نیز در حالت آرامش در خون بچه‌ماهیان دریافت‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$)، اما پس از حمل و نقل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین خون بچه‌ماهیان در هر دو شرایط قبل و بعد از حمل و نقل فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p>۰/۰۵$؛ جدول‌های ۱ و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱) میانگین آماری مقایسه پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی بین تیمارهای مختلف آزمایشی

شاخص	تیمار آزمایشی				
	*کنترل A	*باسیل A	*کنترل B	*باسیل+سدیم‌کلرید	*باسیل B
گلبول سفید (میلی‌متر مکعب)	۱۶/۵۰±۰/۸۵^{ab}	۱۷/۴۰±۰/۴۰^{a}	۱۵/۸۰±۰/۱۱^{b}	۱۶/۳۰±۰/۵۰^{ab}	۱۶/۶۵±۰/۴۵^{ab}
گلبول قرمز (میلی‌متر مکعب/^{۶}۱۰×)	۱/۲۷±۰/۰۶^{a}	۱/۲۱±۰/۸۳^{a}	۱/۵۹±۰/۳۵^{a}	۱/۳۴±۰/۳۷^{a}	۱/۲۲±۰/۱۰^{a}
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	۸/۷۰±۰/۲۰^{a}	۸/۷۰±۰/۱۵^{a}	۸/۷۵±۰/۵۰^{a}	۸/۳۱±۰/۴۴^{a}	۸/۳۰±۰/۲۰^{a}
هماتوکریت (%)	۲۶/۱۵±۰/۹۵^{ab}	۲۵/۶۵±۰/۸۵^{bc}	۲۶/۹۰±۰/۱۰^{a}	۲۴/۷۰±۰/۵۰^{c}	۲۴/۵۸±۰/۴۷^{c}
MCV (fl)	۲۰۱/۹۵±۳۲/۵۴^{ab}	۲۰۲/۵۰±۴۹/۵۲^{ab}	۲۱۴/۸۵±۲۵/۳۵^{a}	۱۶۴/۳۰±۴۰/۲۰^{b}	۲۰۰/۴۵±۲۹/۱۴^{ab}
MCH (pg)	۶۶/۶۰±۲/۰۰^{ab}	۶۸/۶۰±۴/۸۷^{ab}	۷۱/۴۰±۷/۵۰^{a}	۵۵/۲۵±۱۳/۷۵^{b}	۶۵/۲۰±۴/۲۴^{ab}
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	۳۳/۶۰±۰/۱۰^{ab}	۳۳/۲۵±۰/۴۵^{bc}	۳۳/۹۱±۰/۱۰^{a}	۳۳/۰۰±۰/۵۰^{cd}	۳۲/۵۶±۰/۰۵^{d}
لنفوسیت (%)	۶۳/۹۲±۰/۲۵^{c}	۶۷/۱۰±۰/۵۷^{ab}	۶۳/۶۲±۱/۱۵^{c}	۶۷/۸۸±۱/۹۶^{a}	۶۵/۷۵±۰/۶۱^{b}
مونوسیت (%)	۲/۸۶±۰/۱۳^{a}	۲/۴۱±۰/۲۶^{b}	۳/۱۶±۰/۱۶^{a}	۳/۰۰±۰/۰۰^{a}	۲/۹۴±۰/۱۸^{a}
نوتروفیل (%)	۳۱/۴۹±۱/۲۲^{a}	۲۸/۱۷±۱/۸۰^{bc}	۳۲/۱۲±۰/۵۵^{a}	۲۸/۹۴±۰/۵۳^{c}	۳۰/۳۴±۰/۶۱^{ab}
ائوزینوفیل (%)	۱/۳۵±۰/۰۴^{b}	۱/۰۰±۰/۰۱^{c}	۱/۶۳±۰/۰۲^{a}	۰/۸۸±۰/۰۹^{c}	۰/۷۸±۰/۰۵^{c}

*حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشانه معنی‌داربودن است (p<۰/۰۵)؛ کنترل A: گروه شاهد در حالت آرامش؛ باسیل A: تیمار تحت تاثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی در حالت آرامش؛ کنترل B: گروه شاهد بعد از حمل و نقل؛ باسیل+سدیم‌کلرید: تیمار تحت تاثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی+سدیم‌کلرید بعد از حمل و نقل؛ باسیل B: تیمار تحت تاثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی

جدول ۲) مقایسه ضرایب همبستگی پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی بین تیمارهای مختلف آزمایشی

	مونوسیت	ائوزینوفیل	نوتروفیل	لنفوسیت	MCHC	MCH	MCV	هماتوکریت	هموگلوبین	گلبول قرمز	گلبول سفید
گلبول سفید	-۰/۰۷	-۰/۴۷	-۰/۵۲*	۰/۵۸*	۰/۰۲	-۰/۳۶	-۰/۳۶	-۰/۲۷	-۰/۳۲	۰/۱۴	
گلبول قرمز	۰/۴۱	-۰/۲۳	-۰/۳۶	۰/۳۱	-۰/۰۴	-۰/۵۰	-۰/۵۲*	-۰/۰۲	۰/۲۹		
هموگلوبین	۰/۵۳*	۰/۱۱	۰/۰۶	-۰/۱۶	-۰/۶۵**	۰/۴۷	۰/۵۳*	۰/۸۶**			
هماتوکریت	۰/۴۵	-۰/۰۸	-۰/۰۳	-۰/۰۲	-۰/۹۰**	۰/۴۲	۰/۵۳*				
MCV	-۰/۱۲	۰/۴۹	۰/۴۹	-۰/۵۲*	-۰/۲۳	۰/۹۹**					
MCH	-۰/۱۶	۰/۵۵*	۰/۵۴*	-۰/۵۷*	-۰/۱۰						
MCHC	-۰/۴۰	۰/۳۸	۰/۳۳	-۰/۳۰							
لنفوسیت	۰/۲۸	-۰/۷۲**	-۰/۹۷**								
نوتروفیل	-۰/۴۴	۰/۶۰*									
ائوزینوفیل	-۰/۰۳										
مونوسیت											

*: همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است؛ **: همبستگی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است

بحث و نتیجه‌گیری

از پارامترهای خون‌شناسی در ماهیان اغلب به‌عنوان شاخص‌های تعیین استرس استفاده می‌شود[22]. در همین ارتباط *کاسترانوا* و همکاران[23] سطح هموگلوبین خون را به‌عنوان بهترین شاخص خون‌شناسی برای بررسی تاثیر استرس‌های محیطی در گونه‌های مختلف ماهیان عنوان کردند. تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین در خون ماهیان تحت استرس افزایش پیدا می‌کند[22]. در موقعیت‌های استرس‌زا افزایش درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین در پاسخ به تقاضای متابولیکی بالاتر منجر به افزایش ظرفیت حمل اکسیژن توسط خون و درنتیجه تامین نیاز اکسیژنی بافت‌های اصلی می‌شود[24]. در مطالعه حاضر غلظت هموگلوبین خون بچه‌ماهیان کپور تغذیه‌کرده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در کیسه‌های حمل و نقل حاوی نمک و فاقد این ماده در مقایسه با بچه‌ماهیان حمل‌شده در گروه شاهد کاهش یافت که این موضوع بیانگر تغییرات اسمولالیتی خون است. مطالعه *نیلسون و گرو*[25] نشان داد که تحریکات عصبی- هورمونی ناشی از استرس باعث انقباض بافت طحال و درنتیجه افزایش فاکتورهای خونی از جمله تعداد گلبول قرمز و غلظت هموگلوبین می‌شوند. این در حالی است که مقدار این پارامترها با گذشت زمان و حذف عامل استرس‌زا تمایل به بازگشت به سطوح نرمال خود را دارند.

در تایید نتایج حاصل *دابسیکوا* و همکاران[26] با بررسی پارامترهای خون‌شناسی ماهیان کپور معمولی سه‌ساله در فواصل زمانی طولانی‌مدت (۱۲/۵ساعته) اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین خون مشاهده نکردند. این محققین افزایش معنی‌دار درصد هماتوکریت خون در انتهای دوره حمل و نقل را نیز گزارش دادند که برخلاف نتایج مطالعه حاضر بود. در مطالعه‌ای دیگر افزایش معنی‌دار درصد هماتوکریت خون ماهیان کپور معمولی طی حمل و نقل‌های طولانی‌مدت گزارش شد[27]. در مطالعه مذکور اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC خون مشاهده نشد که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود. در مطالعه *رنجدوست* و همکاران[28] حمل و نقل بچه‌ماهیان کپور معمولی در تیمارهای تغذیه‌کرده از ۱×۱۰^{۶}واحد کلنی بر ۱۰۰گرم از باسیلوس‌های

www.SID.ir

Archive of SID

پروبیوتیکی به مدت ۹۰ روز و اضافه‌کردن ۰/۵گرم نمک در هر لیتر آب حمل و نقل (۱۲ساعته) افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون در مقایسه با گروه شاهد گزارش شد. این محققین شاهد کاهش معنی‌دار MCV، MCH، لنفوسیت و نوتروفیل خون نیز در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد بودند، اما در مورد درصد هماتوکریت، مقدار هموگلوبین و MCHC اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نکردند. *احسانی‌کناری* و همکاران[29] نیز طی حمل و نقل طولانی‌مدت (۲۴ساعته) مولدین کپور معمولی و خون‌گیری از آنها بلافاصله پس از صید و در فواصل زمانی ۲ و ۲۴ساعت پس از حمل و نقل نیز شاهد کاهش معنی‌دار گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC خون همسو با افزایش زمان حمل و نقل بودند.

لکوسیتوپنی یا کاهش کلی تعداد گلبول‌های سفید خون یک پاسخ غیراختصاصی در ماهیان به استرس‌های محیطی است[30]. لکوسیتوپنی در ماهیان تحت تاثیر استرس ممکن است به‌دلیل خروج سلول‌ها از جداره رگ‌ها به داخل بافت‌ها و نفوذ آنها به اپی‌تلیوم آبشش، پوست و روده باشد[26]. پدیده کاهش شدید لنفوسیت‌ها (لنفوپنی) و افزایش نوتروفیل‌ها بیش از حد طبیعی (نوتروفیلیا) نیز از جمله پاسخ‌های ثانویه مرتبط با استرس هستند که درنتیجه افزایش ترشح کاته‌کول‌آمین‌ها رخ می‌دهد[26]. گردش سلول‌های ایمنی در طول دوره‌های پراسترس تحت تاثیر هورمون‌های استرس قرار دارد. بنابراین تجمع نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها که از اولین خطوط دفاعی بدن هستند ممکن است برای بقا مهم باشد[24]. *اورتونو* و همکاران[31] چنین بیان داشتند که ازدحام بیش از اندازه جمعیت منجر به مهاجرت لکوسیتی از بافت قدامی کلیه به خون می‌شود. این یافته‌ها هم‌خوان با نتایج *وندلار*[32] است که گزارش داد استرس باعث افزایش سریع نوتروفیل‌ها و کاهش میزان لنفوسیت‌ها در خون محیطی می‌شود. همبستگی معنی‌دار بین لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها ($p<0/01$) در مطالعه حاضر می‌تواند به‌دلیل این واقعیت باشد که این دو شاخص بیش از ۹۰% گلبول‌های سفید خون را تشکیل می‌دهند. در مطالعه حاضر حمل و نقل بچه‌ماهیان در گروه شاهد که در تغذیه و آب حمل و نقل آنها هیچ‌گونه ماده افزودنی اضافه نشده بود کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی داشت. در تضاد با این نتایج، *دوبسیکوا* و همکاران[26] و *احسانی‌کناری* و همکاران[29] اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید، درصد مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌های خون مولدین ماهی کپور معمولی طی حمل و نقل‌های طولانی‌مدت مشاهده نکردند.

به شکل سنتی برای کاهش میزان استرس طی حمل و نقل ماهی از ۰/۵ تا ۲گرم در لیتر (۰/۰۵ تا ۰/۲%) نمک سدیم‌کلرید استفاده می‌شود. اگر ماهی در معرض ۹گرم بر لیتر نمک سدیم‌کلرید قرار گیرد به‌دلیل مطابقت غلظت خون و غلظت محلول فرآیند ازدست‌رفتن نمک رخ نمی‌دهد. اضافه کردن این نمک به آب از طریق کاهش و یا ازبین‌بردن تفاوت غلظت بین خون ماهی و آب باعث توقف و یا کاهش خروج نمک از خون می‌شود. درواقع در صورت استفاده از نمک به‌دلیل ایجاد یک منبع بزرگ برای جذب دوباره و جایگزینی نمک‌های ازدست‌رفته در خون باعث کاهش تقاضای انرژی و عبور ناخواسته جریان از درون به محیط بیرون بدن ماهی می‌شود. استفاده از غلظت‌های بیشتر از ۹گرم بر لیتر سدیم‌کلرید منجر به ازدست‌رفتن آب از خون (اسمز) و درنتیجه خشک‌شدگی و مرگ ماهی می‌شود[12].

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر تاثیرات مثبت باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان کپور معمولی را به‌وضوح نشان داد. به‌طوری که به‌کارگیری این پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی هم در شرایط قبل و هم بعد از حمل و نقل‌های طولانی‌مدت باعث کاهش میزان استرس در این گونه شد. این شرایط قابلیت انتقال آنها را تا فواصل دورتری محیا می‌سازد. همچنین با توجه به کاهش اختلالات مرتبط با پارامترهای خون‌شناسی در بچه‌ماهیان حمل‌شده در کیسه‌های پلاستیکی فاقد نمک به نظر می‌رسد می‌توان از این نوع زیست‌یارها حتی به جای نمک که از آنها به‌عنوان کاهنده‌های عمومی استرس یاد می‌شود، نیز استفاده کرد. برای ابراز نظر قطعی در مورد نتایج حاصل پیشنهاد می‌شود آزمایشی در خصوص استفاده مستقیم پروبیوتیک‌ها در آب و بررسی تاثیر آنها بر شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون انجام شود تا بتوان با قطعیت بیشتری در مورد پتانسیل پروبیوتیک‌ها بر تغییر میزان استرس در شرایط حمل و نقل ماهیان بحث و تبادل نظر داشت.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.
تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.
تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.
سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.
منابع مالی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

1- Hoseinifar SH, Mirvaghefi AR, Mojazi Amiri B, Khoshbavar Rostami HA, Poor Amini M, Darvish Bastami K. The probiotic effects of dietary inactive yeast Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus on growth factors, survival, body composition and intestinal microbiota of Beluga juvenile (Huso huso). Iran Sci Fish J. 2011;19(4):55-66. [Persian]
2- Nikbakhsh J, Bahrekazemi M. Effect of diets containing different levels of prebiotic Mito on the growth factors, survival, body composition, and hematological parameters in common carp Cyprinus carpio fry. J Mar Biol Aquac. 2017;3(1):1-6.
3- Allameh SK, Noaman V, Nahavandi R. Effects of probiotic bacteria on fish performance. Adv Techn Clin Microbiol. 2017;1(2):11.
4- Kiron V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. Anim Feed Sci Technol. 2012;173(1-2):111-33.

www.SID.ir

Archive of SID

5- Conte FS. Stress and the welfare of cultured fish. Appl Anim Behav Sci. 2004;86(3-4):205-23.
6- Harmon TS. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: A review of the basics. Rev Aquac. 2009;1(1):58-66.
7- Schreck CB, Tort L. The concept of stress in fish. In: Schreck CB, Tort L, Farrell AP, Brauner CJ, editors. Fish Physiology: Biology of stress in fish. Cambridge: Academic Press; 2016. pp. 1-34.
8- Francis-Floyd, R. Stress- its role in fish disease. Gainesville: University of Florida IFAS Extension; 1990.
9- Winton JR. Fish health management. In: Wedemeyer GA, editor. Fish hatchery management. 2nd Edition. Bethesda: American Fisheries Society; 2001. pp. 559-639.
10- Carmichael GJ, Tomasso JR, Schwelder TE. Fish transportation. In: Wedemeyer GA editor. Fish hatchery management. 2nd Edition. Bethesda: American Fisheries Society; 2001. pp. 641-60.
11- Küçükgül A, Şahan A. Acute stress response in common carp (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758) of some stressing factors. J Fish Sci. 2008;2(4):623-31.
12- Wurts WA. Using salt to transport live fish. Published as: Using salt to reduce handling stress in channel catfish. World Aquac. 1995;26(3):80-1.
13- McDonald G, Milligan L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Lockridge KA, editor. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press; 1981. pp. 119-44.
14- Sumpter JP. The endocrinology of stress. In: Lockridge KA, editor. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press; 1981. pp. 95-118.
15- Gomez-Gil B, Herrera-Vega MA, Abreu-Grobois FA, Roque A. Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp (Artemia franciscana). Appl Environ Microbiol. 1998;64(6):2318-22.
16- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp Penaeus monodon survival and growth. Aquaculture. 1998;167(3-4):301-13.
17- Ghosh K, Sen SK, Ray AK. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, Bacillus circulans, in formulated diets for rohu, Labeo rohita, fingerlings. Isr J Aquac Bamidgeh. 2003;55(1-4):13-21.
18- Hasanalipour A, Eagderi S, Poorbagher H, Bahmani M. Effects of stocking density on blood cortisol, glucose and cholesterol levels of immature Siberian sturgeon (Acipenser baerii Brandt, 1869). Turk J Fish Aquat Sci. 2013;13(1):27-32.
19- Blaxhall PC, Daisley KW. Routine haematological methods for use with fish blood. J Fish Biol. 1973;5(6):771-81.
20- England JM, Walford DM, Waters DA. Re-assessment of the reliability of the haematocrit. Br J Haematol. 1972;23(2):247-56.
21- Pathiratne A, Rajapakshe W. Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian Cichlid fish, Etroplus suratensis. Asian Fish Sci. 1998;11:203-11.
22- Svobodová Z, Kalab P, Dušek L, Vykusová B, Kolářová J, Janoušková D. The effect of handling and transport of the concentration of glucose and cortisol in blood plasma of common carp. Acta Veterinaria Brno. 1999;68:265-74.
23- Castranova DA, King W, Curry Woods III L. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. Aquaculture. 2005;246(1-4):413-22.
24- Ruane NM, Bonga SW, Balm PH. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. Gen Comp Endocrinol. 1999;115(2):210-9.
25- Nilsson S, Grove DJ. Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod: Gadus morhua. Eur J Pharmacol. 1974;28(1):135-43.
26- Dobšíková R, Svobodova Z, Blahova J, Modra H, Velíšek J. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.). Czech J Anim Sci. 2009;54(11):510-8.
27- Dobšíková R, Svobodová Z, Blahová J, Modrá H, Velíšek J. Stress response to long distance transportation of common carp (Cyprinus carpio L.). Acta Veterinaria Brno. 2006;75(3):437-48.
28- Ranjdost M, Jafaryan H, Harsig M, Gholipour Kananni, H. The effect of Celmanax prebiotic and five probiotic Bacilli species on the decreasing of stress of common carp (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758) during transportation with different salinity. J Aquac Sci, 2018;6(9):39-50 [Persian]
29- Ehsani Kenari J, Esmaeili Fereidouni A, Farokhrouz Lashidani M. Effects of transportation on stress indicators, steroids hormones and hematological parameters of the broodstocks of common carp (Cyprinus carpio). J Exp Biol. 2015;4(1):53-65. [Persian]
30- Khandan Barani H, Heydari MR. The effects of stocking density on some blood and serum biochemical indices of goldfish Carassius auratus. J Exp Biol. 2018;6(4):75-84. [Persian]
31- Ortuno J, Esteban MA, Meseguer J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (Sparus aurata L.) innate immune response. Fish Shellfish Immunol. 2001;11(2):187-97.
32- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. Physiol Rev. 1997;77(3):591-625.

www.SID.ir