فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 23، جلد 6، شماره 4، پائیز 92، صفحه 1 تا 13

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

نگین دلسوز خاکی[1]، حسین خارا[2]، محمود محسنی[3]، علیرضا شناور ماسوله[3]

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، کارشناس ارشد گروه شیلات، لاهیجان. ایران. **negindelsouz@yahoo.com**

2 - دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان. ایران.

3- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت. ایران.

تاریخ دریافت:92/7/25 **تاریخ پذیرش:92/9/17**

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 210 عدد بچه ماهی شیپ با تراکم 10 عدد در هر وان فایبرگلاس در 7 گروه: تیمار1 (4 میلی‌گرم اسید فولیک)، تیمار2(پروبیوتیک 300 گرم)، تیمار3(اسیدفولیک 4 میلی‌گرم و پروبیوتیک 200 گرم)، تیمار4 (اسیدفولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 300 گرم)، تیمار5 (اسید فولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 200)، تیمار6 (اسید فولیک 4 میلی گرم و پروبیوتیک 300 گرم) در 3 تکرار به مدت 8 هفته تغذیه شدند. در پایان آزمایش شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی در آن ها اندازه گیری شد.

یافته ها: بیشترین اختلاف معنی دار تعدادگلبول سفید در تیمار6 مشاهده شد. اثوزینوفیل 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 6 و کمترین این شاخص در شاهد، مشاهده گردید. MCH و MCHC تیمارها، اختلاف معنی داری با هم نداشتند اما بیشترین MCV در تیمار 4 با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار داشت. بیشترین مقدار لیزوزیم در تیمار 6و 5 بود. بیشترین ایمنوگلوبولین و IgM در تیمارهای6و 5 مشاهده گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج فوق می توان اذعان نمود که افزودن 4 میلی گرم اسید فولیک با 300 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

ماهی شیپ *Acipenser nudiventris*, Lovetsky (1828) این تاس‌ماهی بیشتر وابسته به آب‌های جنوبی دریای خزر در بخش های رود کورا، ارس و سفید رود می باشد (2). در دریای خزر کمترین تعداد را در بین همه گونه‌های اقتصادی ماهیان مهاجر خاویاری دارد و حدوداً 1 درصد از کل صید ماهیان خاویاری در دریای خزر را شامل می شود (23). 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 می‌باشند. 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

www.SID.ir

میگوهای پرورشی به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس‌زا می باشد. 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 (4). در جیره غذایی ماهیان 11 نوع ویتامین محلول در آب و 4 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 از اهمیت خاصی برخوردار می‌گردد (15). 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 به کاهش اشتها در رشد، پریشانی، شکنندگی باله‌ها، کم خونی، تجمع رنگدانه‌های سیاه در پوست، خون مردگی در طحال و کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می-انجامد (2). 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 (2000) 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(24). بعد از پایان دوره تغذیه نود روزه، میگوها در معرض باکتری بیماری‌زای *Vibrio harvegi* قرار گرفتند. پس از ده روز، میگوهای تیمار پروبیوتیکی بازماندگی بالاتری (53٪) در مقایسه با گروه شاهد (35/5٪) نشان دادند، که در سطح $P\leq 0/05$ معنی دار بود. تحقیقات Gullian و همکاران (2004) 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(14). Shiau وHuang (2001) رژیم غذایی اسید فولیک مورد نیاز برای حداکثر رشد بچه ماهی هیبرید تیلاپیای *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* با وزن متوسط اولیه(0/01±0/41 g) در مدت زمان 8 هفته و با سطوح (0/0، 0/3، 0/6، 1/0، 3/0، 6/0، 10/0 و 20/0 mg/kg) اسید فولیک، نتایج به‌دست آمده نشان داد که افزایش وزن و بازده غذایی در ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی≥1/0 میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم غذا به طور معنی داری بیشتر از ماهیان تغذیه شده با0/3 میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم غذا و ماهیان شاهد بود(29)، و Shiau Huangدر سال 2001، اسید فولیک مورد نیاز رژیم غذایی میگوی *Penaeus monodon* را اندازه گیری کردند(28).

مواد و روش ها

مطالعه و اجرای این تحقیق در موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان تاسماهیان دریای خزر واقع در 25 کیلومتری شهر رشت و در مجاورت سد سنگر در جوار رودخانه سفید رود در بخش آبزی پروری از مهر ماه تا دی ماه 1391 انجام گردید. در این تحقیق 21 وان 50 لیتری طراحی و اجرا شد. تعداد 210 عدد بچه ماهی

Archive of SID

www.SID.ir

شیپ (*Acipenser nudiventris*) پس از زیست سنجی (اندازه گیری وزن، طول و تعیین بیومس (زی توده) با میانگین وزنی 1/53± 12/84 گرم انتخاب و با تراکم 10 عدد در هر وان کشت شدند. در 7 تیمارغذایی به ترتیب شامل تیمار1(4 میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم جیره)، تیمار 2(پروبیوتیک 300 گرم در هر تن غذا)، تیمار3 (اسیدفولیک 4 میلی گرم، پروبیوتیک 200 گرم)، تیمار4(اسیدفولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 300 گرم)، تیمار5(اسید فولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 200)، تیمار6 (اسید فولیک 4 میلی گرم و پروبیوتیک 300 گرم)در 3 تکرار به مدت 8 هفته تغذیه شدند (21). 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 1). 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 (45%)، چربی (14%)، خاکستر (6/3%) با نسبت P/E (22/14میلی‌گرم پروتئین در کیلو ژول) فرموله شدند (10). پس از تنظیم و تعیین درصد هر یک از اجزای سازنده جیره‌ها، اقدام به ترکیب و آماده سازی آن ها توسط دستگاه پلت‌زن CPM شد. پلت‌ها به قطر 2 میلی‌متر تهیه و به مدت 24 ساعت در دستگاه خشک‌کن در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به منظور کاهش دما به میزان 9 تا 10٪ 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 ۲۰۰،۳۰۰ گرم به ازاء هرتن خوراک و اسید فولیک به نسبت های 2و 4 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 گرفت. اسید فولیک، ساخت شرکت .Dae jung chemical Korea با خلوص 96 درصد، پروبیوتیک Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) محصول شرکت Lallemand .

نحوه غذادهی و زیست سنجی

بچه ماهیان به مدت 8 هفته با جیره های غذایی آزمایشی شامل تیمار1(4 میلی گرم اسید فولیک در کیلوگرم جیره)، تیمار 2(پروبیوتیک 300 گرم در هر تن غذا)، تیمار 3(اسیدفولیک 4 میلی گرم، پروبیوتیک 200 گرم)، تیمار4(اسیدفولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 300 گرم)، تیمار5(اسید فولیک 2 میلی گرم پروبیوتیک 200)، تیمار6(اسید فولیک 4 میلی گرم و پروبیوتیک 300 گرم) در 3 تکرارو 2 نوبت (9 صبح و 15 عصر) تغذیه شدند(23، 3)، زی‌توده ماهیان هر 2 هفته یک‌بار وهم چنین انتهای دوره پرورش با ترازوی دقت 0/1 گرم توزین شدند. متوسط طول کل ماهیان با متر پارچه ای اندازه گیری شد. قبل از انجام مراحل زیست سنجی، بچه ماهیان به مدت 18 ساعت گرسنه نگه داشته شدند تا میزان استرس ماهیان به حداقل کاهش یابد (10، 1). بعد از طی دوره پرورش (8 هفته) و 24 ساعت بعد از آخرین بیو متری 30 درصد از جمعت ماهیان در هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و از سرنگ 3 سی سی از ساقه دمی نمونه خون

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه و جهت اندازه گیری شاخص‌های خونی(گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت) و فاکتورهای ایمنی (لیزوزیم، Total IgM 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 (31).

روش اندازه گیری فاکتورهای خونی و ایمنی

شمارش گلبول-های قرمز (RBC)**:** با استفاده از پیپت ملانژور قرمز، با رقت 1 به 200، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در 5 خانه مرکزی لام شمارش شده و در عدد 10000 ضرب می گردد)(20، 9، 7).

شمارش گلبول های سفید (WBC) **:** با استفاده از پیپت ملانژور سفید، با رقت 1 به 20، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در 4 خانه مخصوص گلبول های سفید شمارش شده در عدد 50 ضرب می گردد) (20، 9، 7).

اندازه گیری هماتوکریت (HCT) **:** 3/2 لوله میکرو هماتوکریت را از خون پرکرده، پس از مسدود نمودن انتهای لوله با خمیر هماتوکریت، لوله را با سانتریفیوژ با دور 7000 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کرده و با خط کش مخصوص، میزان آن برحسب درصد قرائت می گردد (21).

اندازه گیری هموگلوبین (Hb) **:** اندازه گیری آن به روش سیان مت یا سیانید هموگلوبین و با اسپکتروفتومتر با طول موج 540nm بر حسب گرم در دسی لیتر انجام می شود (20، 9، 7).

اندازه گیری ایمونوگلوبولین 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 340 نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد (19، 5).

اندازه گیری لیزوزیم: برای اندازه گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، 57/1 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار0/375میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم 0/05 مولار با pH برابر 62/2) با 250 میکرولیتر از نمونه های سرم مخلوط و جذب نوری پس از 15 و 180 ثانیه به روش طیف سنجی وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 670 نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد (13).

اندازه گیری غلظت ایمنوگلوبولین کل : 1 میلی لیتر از هر نمونه سرم با 0/1 میلی لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول 32٪ مخلوط شد و مخلوط برای مدت 2 ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمنوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمنوگلوبولین توسط سانتریفیوژ در5000 دور در 4 درجه سانتی گراد برداشته شد. پروتئین کل در مایع شناور اندازه گیری، مقدار ایمنوگلوبولین به‌صورت(میلی گرم در هر میلی لیتر) بیان گردید (32، 30).

تحلیل آماری داده ها

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 داده ها (آزمون Shapiro-wilk)آزمون های تجزیه واریانس یک طرفه (Oneway ANOVA) در سطح اطمینان 95% 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

Archive of SID

www.SID.ir

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

جدول 1- ترکیب غذایی و آنالیز تقریبی جیره شاهد

آرد ماهی	354
پودر گوشت	86
مخمر	100
گلوتن گندم	50
آرد گندم	200
نمک	10
ویتامین پرمیکس	20
پرمیکس معدنی	10
متیونین + سیستئین	15
لایزین	15
ملاس	20
روغن ماهی	65
ماده خشک (گرم در کیلوگرم)	874
پروتئین	397
چربی	90
خاکستر	55/2
انرژی ناخالص (مگاژول در کیلوگرم جیره)	18/97
نسبت پروتئین به انرژی (میلیگرم در کیلوژول)	21/38

نتایج

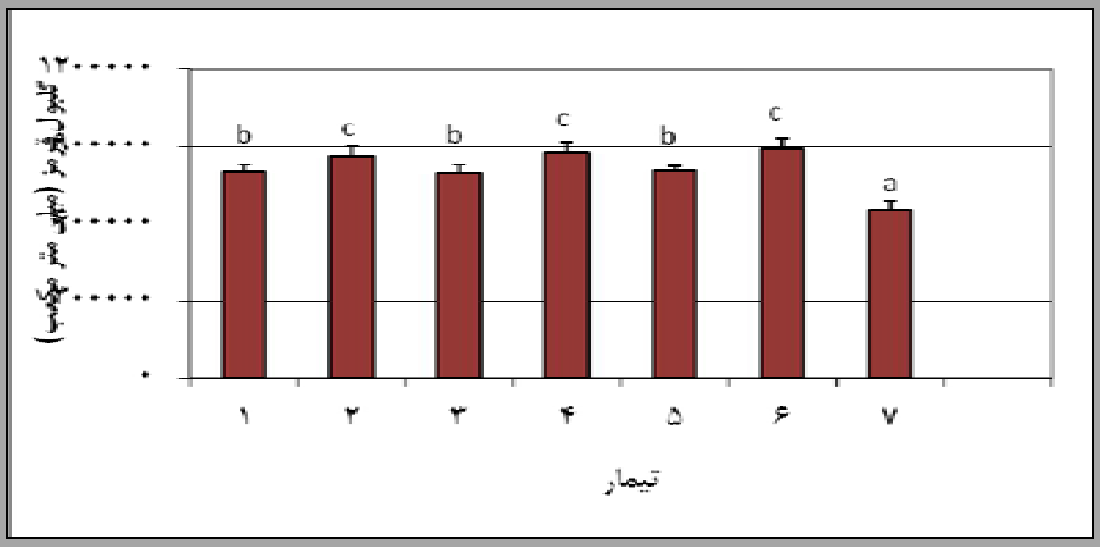
با توجه به اهمیت فاکتورهای محیطی از جمله اکسیژن محلول، دما و pH و تاثیر آن ها بر تغذیه و در نهایت رشد ماهیان، این فاکتورها در تمام مدت پرورش به‌طور روزانه کنترل گردید نتایج پارامترهای کیفی آب هیچ-گونه اختلاف معنی‌داری را در طول دوره پرورش نسبت به یکدیگر نشان نداد ($P \geq 0/05$) (جدول2). نتایج این تحقیق 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 4 میلی‌گرم اسید فولیک + 300 میلی گرم پروبیوتیک دارای بیشترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت به ترتیب با مقادیر (43760/7 ± 890500 میلی متر مکعب)، (2030/4 ±13175 میلی متر مکعب)، (0/3 ± 7/47 گرم در دسی لیتر)، (1/26 ± 37/75 درصد) دارا بودند که بر اساس آزمون کروسکال - والیس اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد($P<0/05$).

www.SID.ir

جدول 2- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه گیری شده در طول مدت پرورش

مقاطع زمانی / فاکتورها	دوره پرورش با غذای کنسانتره								
	1	2	3	4	5	6	7	8	میانگین
میانگین دمای آب (درجه سانتی گراد)	21/7	20/5	20/3	19/2	18/7	16/4	15/3	15	18/39
میانگین اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	7/8	8	8/1	8/3	8/1	7/9	7/3	7	7/8
pH	7/3	7/3	7/4	7/4	6/3	7	7/2	6/9	7/1

هم چنین میزان نوتروفیل، مونوسیت، به ترتیب با مقادیر(1/71 ± 36/75 درصد)، (0/58 ± 4/5 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، ایمونوگلوبولین M و ایمونوگلوبولین کل در ماهیان تغذیه شه با جیره غذایی(فولیک اسید 4 میلی گرم+ پروبیوتیک 300گرم در هر تن غذا) از مقادیر بیشتری برخوردار بودند، اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0/05$)(نمودار 1-11).

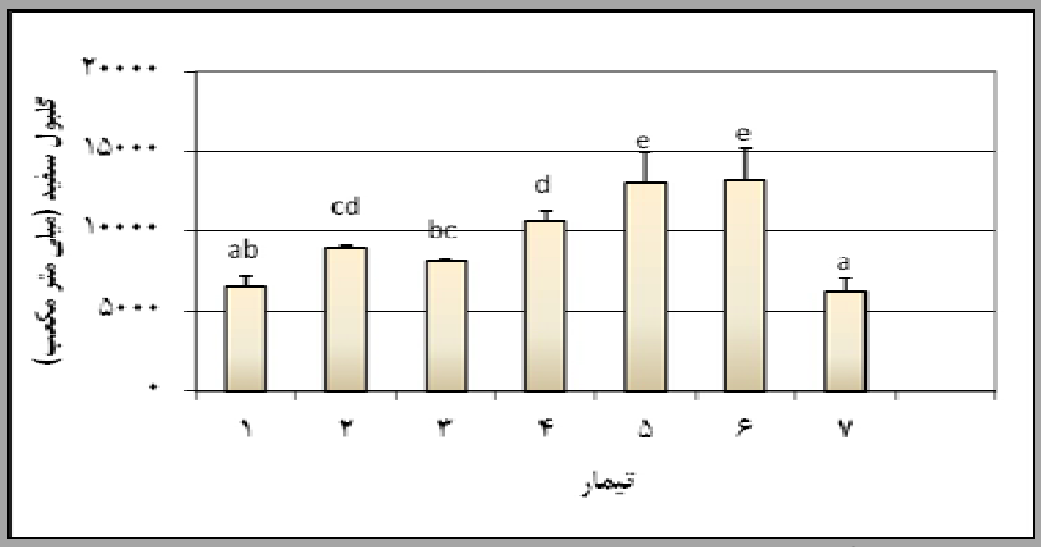


نمودار1- میانگین تغییرات گلبول‌های قرمز سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی متر مکعب)

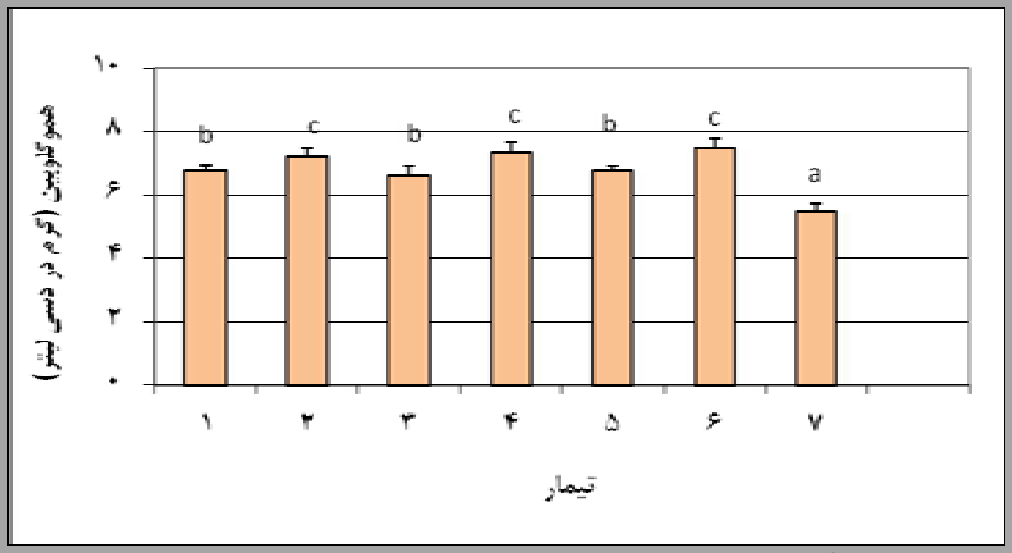
بحث و نتیجه گیری

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 گردد. تاکنون در خصوص تاثیر پروبیوتیک ها بر تعداد گلبول های سفید در این نوع باکتری ها مطالعه ای انجام نشده است، با این‌که بیان شده که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی بادی ها در ارتباط است (17).

www.SID.ir



نمودار2- میانگین تغییرات گلبولهای سفید سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی متر مکعب)

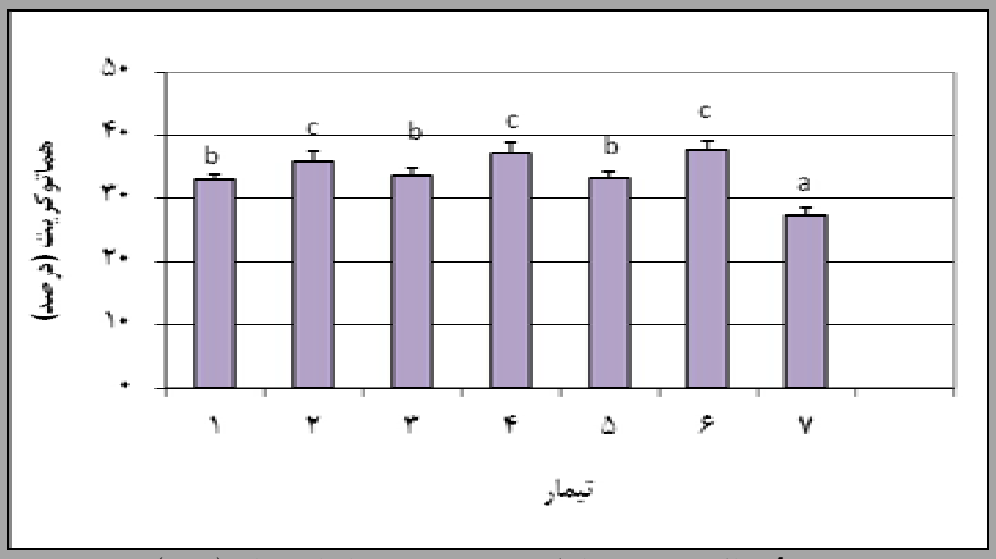


نمودار3- میانگین تغییرات هموگلوبین سرم خون در تیمارهای مختلف (گرم در دسی لیتر)

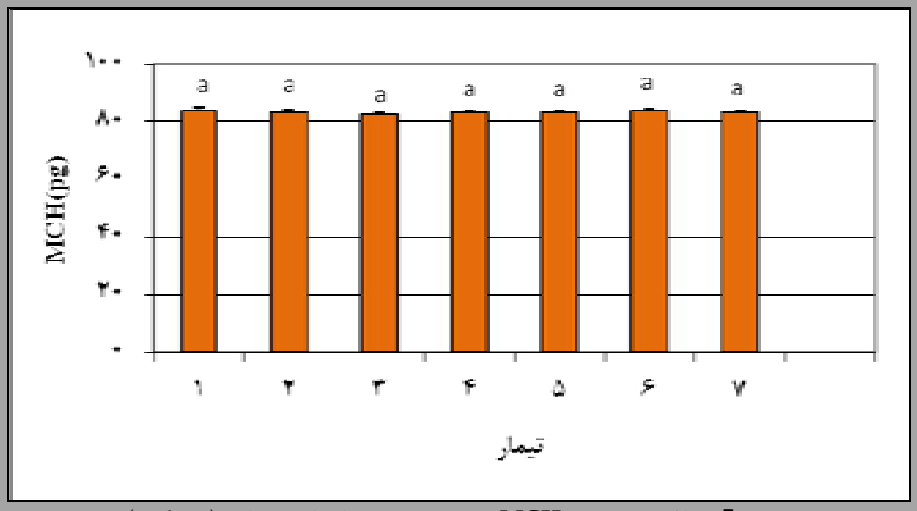
برخی عوامل سلولی از قبیل فاگوسیتوزیس گلبول های سفید (18) و فعالیت لنفوسیت ها (30، 18) نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی ها ایفا می نمایند. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبول های سفید انسان توسط باکتری های اسید لاکتیک موجود است (26، 22، 12). مطالعات Irianto & Austin (2002) این نظریه را که تحریک سلولی (یعنی افزایش لنفوسیت های گلبول سفید و کل تعداد ماکروفاژها و افزایش بیگانه خواری) بیشتر از ایمنی توانایی بیشتری بیگانه خواری دارند(16). همورال دارای اهمیت می باشد، را تایید می کند، هم چنین Brunt & Austin (2005) 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 تعداد گلبول قرمز در

www.SID.ir

تیمار (6)، (4)و (2)درصد اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد نشان داد،که تاثیر پروبیوتیک در بهبود اکسیژن رسانی به بافت ها و فرایند سوخت و ساز و انتقالCO_2 از بافت ها به بیرون بدن می باشد (8). از آن‌جایی که هموگلوبین پروتئینی است که 95 درصد گلبول قرمز را تشکیل می دهد، نتایج هموگلوبین با تعداد گلبول قرمز مطابقت دارد (32). هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد (31). میزان (MCH) و (MCHC) سرم خون در تیمارهای حاوی پری بیوتیک و اسید فولیک نسبت به تیمار شاهد فاقد اختلاف معنی دار آماری بودند (P>0/05).

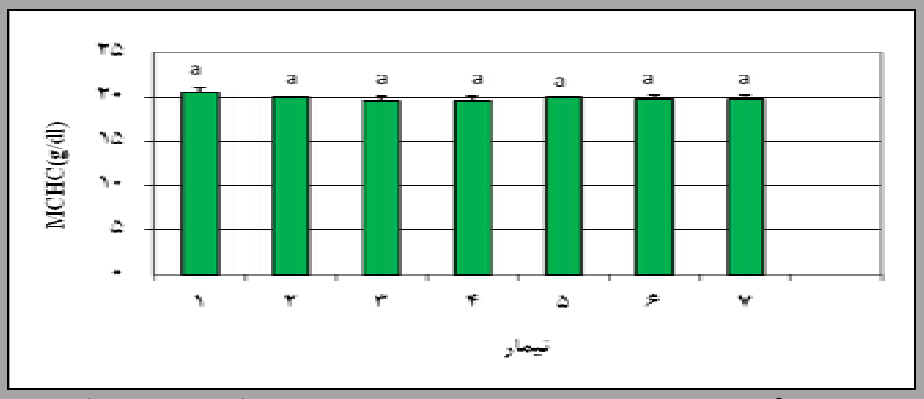


نمودار4- میانگین تغییرات هماتوکریت سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)

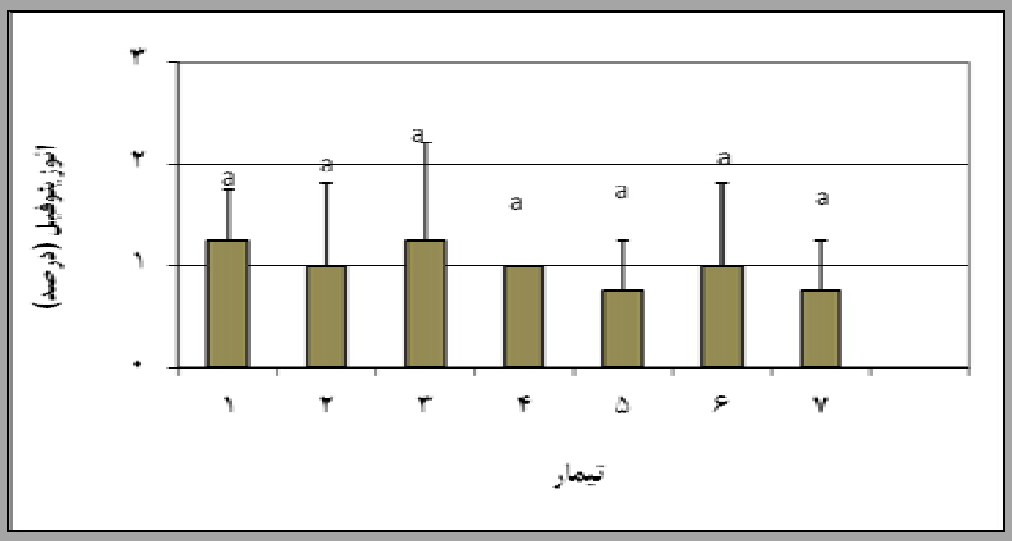


نمودار5- میانگین تغییرات MCH سرم خون در تیمارهای مختلف (پیکوگرم)

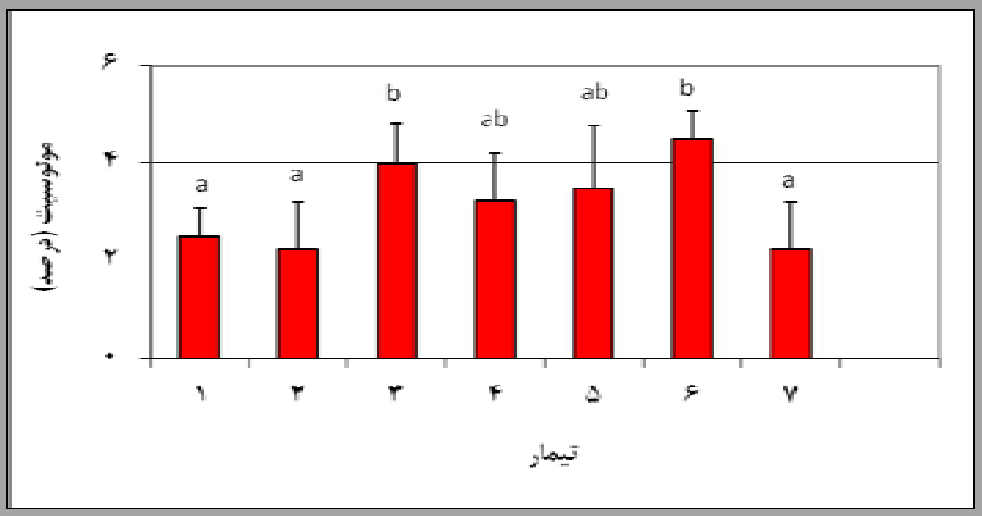
www.SID.ir



نمودار6- میانگین تغییرات MCHC سرم خون در تیمارهای مختلف (گرم در دسی لیتر)

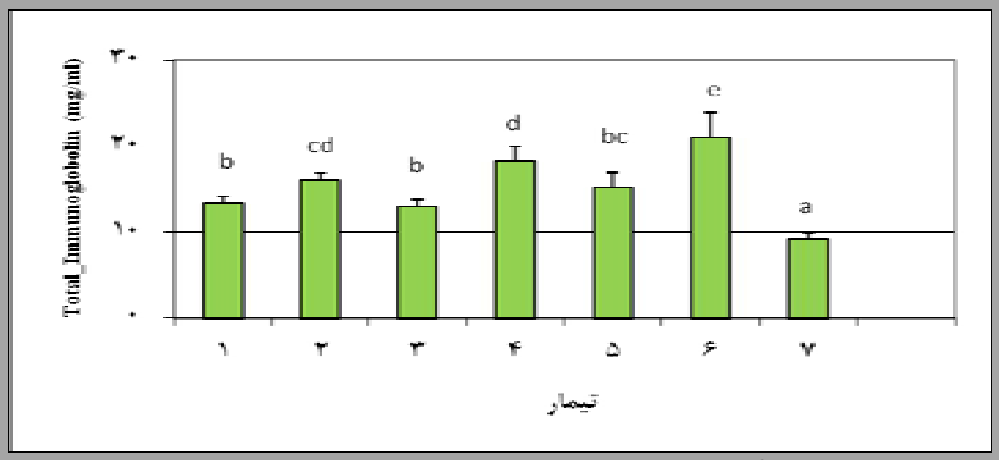


نمودار7- میانگین تغییرات ائوزینوفیل سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)

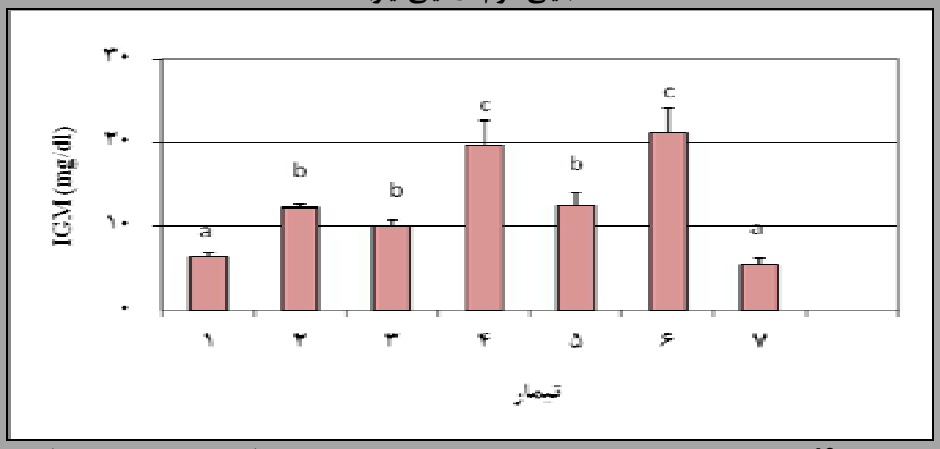


نمودار8- میانگین تغییرات مونوسیت سرم خون در تیمارهای مختلف (درصد)

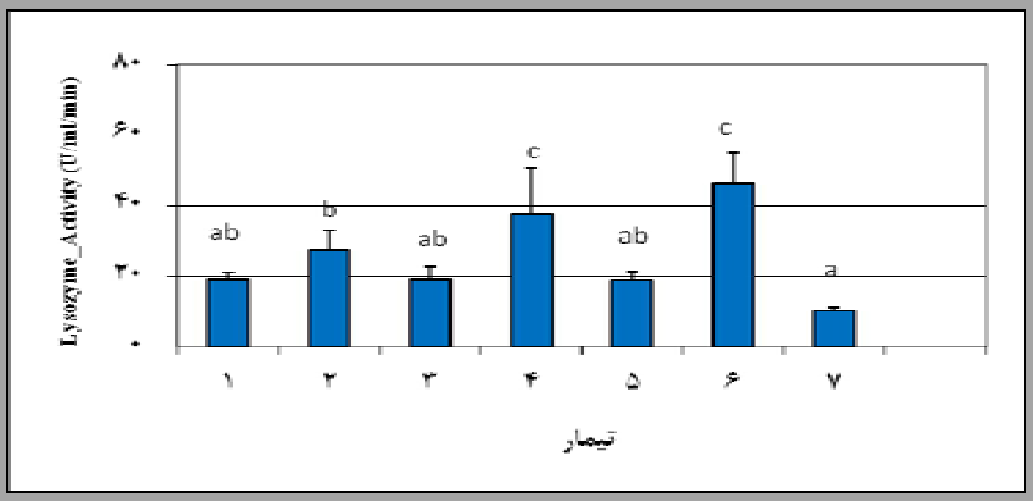
www.SID.ir



نمودار9- میانگین تغییرات ایمنوگلوبین کل سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی گرم در میلی لیتر)



نمودار10- میانگین تغییرات ایمنوگلوبین سرم خون در تیمارهای مختلف (میلی گرم در دسی لیتر)



نمودار11- میانگین تغییرات لیزوزیم سرم خون در تیمارهای مختلف (U/ml/min)

www.SID.ir

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 <0/05). ماهیان تغذیه شده با تیمارهای (6) و(3) 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 یافته ها نسبت به گرانولوسیت ها بسیار بیگانه خوارترند. عمده ترین فعالیت نوتروفیل ها انجام عمل فاگوسیتوز فعال می باشد (8) 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 5 بیشتر از سایرین است. حداکثر میزان ایمنوگلوبین کل Ig سرم خون مربوط به تیمار 6 می باشد. طبق نتایج به‌دست آمده میزان لنفوسیت ها، ایمنوگلوبولین کل Ig و ایمنوگلوبولین M (IgM) بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی دار آماری دیده شد.

میزان فعالیت لیزوزیم سرم به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیراختصاصی در ماهی می باشد (25) و افزایش آن پس از مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکان ها و تحریک آنتی ژن افزایش می یابد (6) میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار6 و4افزایش 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 6 هستند و هم چنین بتاگلوکان و مانان الیگوساکارید طبق گزارشاتی بر فعالیت لیزوزیم تاثیرگذار می باشند (24).

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

1-ابراهیمی، ع.، پوررضا، ج.، پاناماریوف، س.، کمالی، الف.، حسینی، ع. 1383. 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 1383. صفحات 229 تا 241.

2-افشار مازندران،ن.1381.راهنمای علمی تغذیه و نهاده های غذایی و دارویی آبزیان در ایران.چاپ سما رنگ.چاپ اول.216ص.

3-پور علی، ح.ر.، محسنی، م.، آق تومان، و.، توکلی، م. 1382. پرورش بچه ماهیان با در صدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده. مجله علمی شیلات ایران. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ماهیان خاویاری، صفحات 37 تا 48.

4-حسینی فر، ح.، میرواقعی، ع.، مجازی، پ.، خوشباور، ح.، پورامینی، م.، درویش بسطامی، ک. 1389. 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 4. 12 صفحه.

5-سقا، ح.ر.، سروش نیا، م. 1382. کتاب جامع تجهیزات و فرآوردهای آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. 2687 صفحه.

6-سلطانی، م.، 1387. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. 264 صفحه.

Archive of SID

www.SID.ir

7-عامری مهابادی، م، 1378. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. 126 صفحه.

8-کاظمی، ر. الف .، پوردهقانی، م .، یوسفی، الف.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. 1389 . فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. 194 صفحه.

9-مجابی، ع.، حیدر نژاد، الف. 1382. خون شناسی دامپزشکی و روش های آزمایشگاهی. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. 214 صفحه.

10-محسنی، م.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی، ر.، آقتومان، و. 1385. 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. 136 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

Archive of SID

www.SID.ir

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). 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.

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.

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

Archive of SID

www.SID.ir