# اثر انتروکوکوس‌فکالیس (*Enterococcus faecalis*) به‌عنوان پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی و سرمی بچه تاسماهیان ایرانی (*Acipencer persicus*)

**مهدی علیزاده رودپشتی*[۱]، علیرضا شناور ماسوله[۱]، جلیل جلیل پور[۱]، مهدی معصوم زاده [۱]، سهیل بازاری مقدم[۱]، هوشنگ یگانه [۱]، لیلا عزیز زاده [۱]**

۱ - موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت: ۳ مهر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۶ بهمن ۱۳۹۵

**چکیده**

یکی از روش‌های بالا بردن سطح ایمنی و سلامت ماهیان استفاده از مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها می‌باشد. این تحقیق با هدف کاربرد باکتری انتروکوکوس فیکالیس در تغذیه و تاثیر آن روی فاکتورهای بیوشیمیایی و خونی بچه تاسماهیان ایرانی در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر طی سال‌های ۱۳۹۳- ۱۳۸۹ انجام گرفت. تعداد ۹۶ عدد بچه تاسماهی ایرانی با متوسط وزن (۹/۲۴±۰/۱۴g) و میانگین طول کل (۱۴/۳۹±۰/۴cm) با تراکم ۸ عدد بچه ماهی به ۱۲ وان پرورشی فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با قطر و ارتفاع ۱ متر با منبع تامین آب مشترک رودخانه سفیدرود و چاه، مجهز به هواده به صورت تیماربندی در قالب طرح کاملا تصادفی (۴ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار) انتقال یافت. تیمار شاهد (مصرف غذای پایه بدون افزودن *E. faecalis*)، تیمار اول، دوم و سوم (مصرف غذای پایه با افزودن *E. faecalis*) به ترتیب به میزان $۱۰^{۷}$ ، $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$ (CFU در هر گرم غذا) بود. اثر *E. faecalis* پس از افزودن به غذا در یک دوره ۶۰ روزه پرورش روی ایمنی بچه‌ماهیان بررسی شد. استفاده از این باکتری بهبود معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم، IgM، هموگلوبین، گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین ذره‌ای و نوتروفیل نشان داد، بنابراین *E. faecalis* می‌تواند در بهبود ایمنی و بهداشت بچه‌تاسماهی ایرانی به عنوان یک پروبیوتیک پیشنهادی موثر باشد.

**کلمات کلیدی:** انتروکوکوس فیکالیس، پروبیوتیک، تاسماهی ایرانی، شاخص‌های خونی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). ana_alizadeh2003@yahoo.com

**مقدمه**

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در آبزی‌پروری در راستای استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک جهت نیل به اهداف گوناگون نظیر کاهش بیماری‌های عفونی و غیرعفونی (Son *et al*., 2009)، Sharifuzzaman و Austin(۲۰۰۹)، Hai و همکاران (۲۰۰۹)، کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک، بهبود gonadosomatic index (GSI) و لقاح درمولدین (Abd- Rhman *et al*., 2009 El)، بهبود تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی، کنترل تکثیر و فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا، تحریک سیستم ایمنی (Díaz-Rosales *et al*., 2009)، روند کاهش استرس و حساسیت به بیماری‌ها (Wang and Zirong, 2006) بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی (Abd El-Rhman *et al*., 2009) و همچنین بهبود درصد بقاء و کاهش تلفات Rengpipat و همکاران (۲۰۰۸)، Aly و همکاران (۲۰۰۸c)، Hai و همکاران (۲۰۰۹) انجام گرفته است. با توجه به حساسیت بیش‌تر این گونه در فواصل بین لاروی تا بچه ماهی آماده تغذیه و تلفات بالای آن نیاز به تقویت و بالا بردن سطح ایمنی این بچه‌ماهیان ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعات فوق‌الذکر نشان داده است که به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها بصورت انفرادی و یا ترکیبی می‌تواند هر دو سیستم هومورال و سلولار را تحت تاثیر قرار دهد و همچنین سبب ایمنی موضعی در ماهی شود. پروبیوتیک‌ها قادرند با سلول‌های ایمنی نظیر سلول‌های فاگوسیت کننده تک‌هسته‌ای (مونوسیت‌ها، ماکروفاژها) و لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلوئر (نوتروفیل‌ها) و سلول‌های NK واکنش داده و منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی ذاتی شوند. همچنین مانند سایر مهره‌داران، برخی از پروبیوتیک‌ها می‌توانند تعداد اریتروسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها را نیز در انواعی از ماهیان افزایش دهند به‌علاوه پروبیوتیک‌ها در شرایط Invitro و Invivo تکثیر لنفوسیت‌های B را در ماهیان به‌طور فعال تحریک می‌کنند. بالا بردن سطح ایمنوگلوبولین به وسیله پروبیوتیک‌های مکمل در تعدادی از جانوران از جمله ماهیان گزارش شده است (Nayak, 2010)، Song و همکاران (۲۰۰۶) سطح بالای ایمنوگلوبولین را در موکوس پوست ماهی Chinese drum (*Miichthys miiuy*) به‌وسیله مصرف *Clostridium butyricum* نشان دادند. انواعی از باکتری‌های اسیدلاکتیک به فرم زنده (viable) و غیرزنده (non-viable) نشان دادند که قادرند تا سطح ایمنوگلوبولین را در ماهی بالا ببرند به‌طوری‌که با مصرف مکمل پروبیوتیک *L.rhamnosus* با غلظت $۱۰^{۸}$ (CFU g-1)در یک هفته، سطح ایمنوگلوبولین در قزل‌آلا به‌طورمعنی‌داری افزایش یافت (Sharifuzzaman and Austin, 2009) همچنین Balcazar و همکاران (۲۰۰۷) با به‌کارگیری غذایی باکتری‌های اسیدلاکتیک *Lactococcus lactis* subsp.، *Lactobacillus sakei* و *Leuconostoc mesenteroides* با غلظت $۱۰^{۶}$ CFU (g-1) به مدت ۲ هفته، افزایش سطح ایمنوگلوبولین را در قزل‌آلای قهوه‌ای مشاهده کردند. فعالیت فاگوسیتیک برای فعال-سازی اولیه پاسخ التهابی قبل از تولید آنتی‌بادی مورد نیاز بوده و نقش مهمی در دفاع ضد باکتریایی ایفا می‌کند. پروبیوتیک‌ها می توانند به‌طور موثر سلول‌های فاگوسیتیک را در میزبان فعال کنند. افزایش فعالیت فاگوسیتیک توسط تعدادی از باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر *Lactococcus. L. lactis* ،*rhamnosus* و *Lactobacillus*

*acidophilus* در تعدادی از جانوران مشاهده شده است (Nayak, 2010). این پروبیوتیک‌ها اغلب در آبزی‌پروری نیز مورد آزمون قرار گرفته‌اند و به‌کارگیری آن‌ها به‌صورت زنده و غیر زنده سبب تحریک فعالیت فاگوسیتیک در برخی از ماهیان شد و به‌کارگیری باکتری *Clostridium butyricum* از طریق تغذیه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش فعالیت فاگوسیتیک گردید (Nayak, 2010). سیستم ایمنی غیر اختصاصی نیز توسط پروبیوتیک‌ها قابل تحریک می‌باشد. به‌طور مثال مصرف خوراکی *C. butyricum* در قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش فعالیت فاگوسیتیک لوکوسیت‌ها موجب افزایش مقاومت آن به ویبریوزیس شده است (Balcazar *et al*., 2006) به‌علاوه Nikoskelainen در سال ۲۰۰۳ نشان داد که به‌کارگیری باکتری اسیدلاکتیک *L. rhamnosus* به میزان $10^5$ (CFU $g^{-1}$) غذا می‌تواند انفجار تنفسی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحریک نماید. Vazquez و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اسیداستیک و اسید لاکتیک تولید شده توسط انواع باکتری‌های *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc*، *Pediococcus* و *Carnobacterium* دارای اثرات ممانعت‌کنندگی بر روی انواعی از ویبریوهای بیماری‌زا بوده‌اند. Brunt و همکاران(۲۰۰۷) مطالعه کردند که Bacillus جداسازی شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین *A. sobria* که ازماهی کپور(*Cyprinus sp.*) جداسازی گردید دارای اثرات پروبیوتیکی بر علیه عفونت‌های ناشی از *Streptococcus iniae*، *L. garvieae*، *Aeromonas salmonicida*، *Yersinia ruckeri*، *Vibrio ordalii* و *V. anguillarum* بوده‌اند. مصرف این پروبیوتیک‌ها افزایش لیزوزیم، فعالیت انفجار تنفسی و فاگوسیتوز را نیز در میزبان به همراه داشته است. همچنین این بررسی نشان داد که پس از استفاده از پروبیوتیک‌ها به مدت ۱۴ روز و سپس مواجهه سازی با باکتری‌های بیماری‌زا میزان تلفات در گروه‌های تیمار کم‌تر از شاهد بود و فعالیت کمپلمان، لیزوزیم، گلوتاتیون پراکسیداز، فاگوسیتیک، ایندکس فاگوسیتیک و انفجار تنفسی نیز در اثر مصرف این باکتری افزایش داشته است. استفاده از اجزای سلولی ویبریو هاروی و پروبیوتیک‌ها سبب تحریک پاسخ‌های ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید (Arijo *et al*., 2008). مطالعه Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) تعیین نمود که احتمالا بقای (Viability) پروبیوتیک‌ها می تواند در القای پاسخ‌های ایمنی در قزل‌آلای رنگین کمان موثر باشد. به‌کارگیری باکتری‌های *Lactobacillus lactis delbrueckii ssp.* و *Bacillus subtilis* در پاسخ‌های ایمنی سلولی ماهی سیم سر طلایی Gilthead seabream نیز توسط Salinas و همکاران (۲۰۰۵) مورد مطالعه قرار گرفت و در بررسی دیگر توسط Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) افزایش پاسخ‌های ایمنی در قزل‌آلای رنگین کمان ناشی از مصرف *L. rhamnosus* مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج مثبتی به همراه داشته است. هدف از این مطالعه، استفاده از باکتری انتروکوکوس فیکالیس در تغذیه و تاثیر آن بر روی فاکتورهای ایمنی و خونی بچه تاسماهیان ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق بخشی از پروژه مصوب " امکان‌سنجی تولید باکتری اسیدلاکتیک (انتروکوکوس فیکالیس) در

پرورش تاس‌ماهیان ایرانی زیر یک سال" در موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر طی سال های ۹۳-۸۹ بود، تعداد ۹۶ عدد بچه تاسماهی‌ایرانی با متوسط وزن (۹/۲۴±۰/۱۴g) و میانگین طول کل (۱۴/۳۹±۰/۴cm) با تراکم ۸ عدد بچه‌ماهی به ۱۲ وان پرورشی فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با قطر و ارتفاع ۱ متری با منبع تامین آب مشترک رودخانه سفیدرود و چاه، مجهز به هواده به صورت تیماربندی در قالب طرح کاملا تصادفی (۴ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار) انتقال یافت که شامل تیمار ۱، ۲، ۳ و شاهد بود، تیمارهای آزمایشی شامل شماره‌های ۱ تا ۳ وان‌های شاهد (مصرف غذای پایه بدون افزودن *E. faecalis*)، شماره‌های ۴ تا ۶ وان‌های تیمار اول (مصرف غذای پایه با افزودن *E. faecalis*) به میزان $10^7$ CFU در هر گرم غذا)، شماره‌های ۷ تا ۹ وان‌های تیمار دوم (مصرف غذای پایه با افزودن *E. faecalis*) به میزان $10^8$ CFU در هر گرم غذا) و شماره‌های ۱۰ تا ۱۲ وان‌های تیمار سوم (مصرف غذای پایه با افزودن *E. faecalis*) به میزان $10^9$ CFU در هر گرم غذا) بود. نوع غذا بیومار (فرانسه) با آنالیز پروتئین ۴۷٪، چربی ۱۴ ٪، فیبر ۳/۱ ٪، خاکستر ۸/۱ ٪، فسفر ۰/۸۸ ٪ ، کلسیم ۲/۳۴ ٪ ، سدیم ۰/۲۷ ٪ ، ویتامین A ۷۵۰۰ (Ui/kg) ، ویتامین D3 ۱۵۰۰ (Ui/kg) ، مس ۱/۶ ، منگنز ۱۲/۶، روی ۷۸/۶، ید ۱/۹ و اتوکسی‌کوئین ۱/۹ (mg/kg) بود و باکتری انتروکوکس در بانک ژن NCBI ( National Center for Biotechnology Information) توسط موسسه با کد JF831161 ثبت شد. تراکم سوسپانسیون سلول‌های باکتری با دستگاه نانومتر تعیین گردید و اضافه کردن سوسپانسیون سلول‌های باکتری به پلت‌های غذایی برای تهیه غذا حاوی باکتری با تراکم‌های $10^9$ – $10^7$ سلول باکتری در هر گرم غذا انجام شد. میانگین فاکتورهای محیطی نظیر دما، اکسیژن و pH طی دوره تغذیه توسط دستگاه water checher (Hana model) مورد ثبت قرارگرفت. در طی این دوره میانگین دمای آب در وان‌های پرورشی ۰/۰۹ ± ۱۷/۲درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن ۰/۵±۸/۴۸ میلی‌گرم / لیتر و همچنین محدوده pH بین ۷/۳-۶/۱ بوده است. پس از گذشت دو هفته سازگاری، ماهیان روزانه دو بار به میزان ۳-۲ ٪ وزن بدن طی ۶۰ روز مورد تغذیه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فاکتورهای خونی: در انتهای دوره پرورش (از هر تیمار ۹ عدد ماهی) با وزن متوسط ۲۵/۸ گرم به‌طور تصادفی جهت شمارش گلبول‌های سفید، قرمز و همچنین تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید و تهیه گسترش خونی مورد نمونه برداری قرار گرفت. پس از بی‌هوشی ماهیان توسط MS222 (۲۰۰ ppm)، خون‌گیری از آنها به وسیله سرنگ دو میلی‌لیتری از ساقه دمی انجام گردید. شاخص‌های خونی (CBC) به روش استاندارد در آزمایشگاه بر روی نمونه خون آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین صورت گرفت. به وسیله پیپت ملانژور و محلول رقیق کننده رنگی، نمونه خون رقیق شده و روی لام هموسیتومتر نئوبار، تعداد گویچه‌های قرمز (RBC) و تعداد گویچه‌های سفید (WBC) در میلی‌متر مکعب خون با سه تکرار برای هر نمونه محاسبه گردید. از هر نمونه خون دو گسترش روی لام تهیه و پس از خشک و فیکس کردن، با محلول گیمسا ۱۰ درصد رقیق شده، رنگ آمیزی و شمارش افتراقی انجام گردید و درصد فراوانی هر گروه از لکوسیت‌ها (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ترمبوسیت‌ها) با سه تکرار برای هر نمونه صورت گرفت. با پرکردن لوله‌های موئینه هپارینه و

بستن آن با خمیر مخصوص پس از سانتریفیوژ با سرعت حداقل ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با سانتریفیوژ میکروهماتوکریت مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه خون محاسبه گردید (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). مقدار هموگلوبین هر نمونه خون نیز به وسیله کیت مخصوص و به روش کلرومتریک در طول موج ۵۴۰ توسط دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین گردید. به کمک نتایج بدست آمده، شاخص‌های گلبول قرمز (Red blood cell indices) به ترتیب ذیل مورد محاسبه قرار گرفت:

الف- حجم متوسط یاخته‌ای MCV (Mean Corpuscular Volume):

$$MCV=\frac{Hematocrit}{RBC(million/mm^3)}\times 10$$

ب- میانگین هموگلوبین ذره‌ای MCH (Mean Corpuscular Haemoglobin):

$$MCH = \frac{Hemoglobin\ \ (g/dcl)}{RBC\ (million\ /mm^3)}\times 10$$

ج – میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای MCHC (Mean Corpuscular Concentration Haemoglobin):

$$MCHC = \frac{Hemoglobin\ (g/dcl)}{Hematocrit}\times 100$$

در ادامه از خون حاوی ضد انعقاد و فاقد ضد انعقاد جهت تهیه سرم در سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید و سپس سرم از سطح ظروف جمع آوری گردید و پس از شماره گذاری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و جهت آزمایش‌های سرولوژی مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفات (ALP) سنجش آنزیم‌های فوق با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس‌آزمون (www.parsazmun.com) توسط دستگاه اتوآنالایزر مدل BT-1500 (Biotecnica Italy Instruments) صورت گرفت برای سنجش ایمنوگلوبولین M (IgM) از روش نفلومتری و توصیه شده توسط Zilva و Pannall (۱۹۸۴) و دستگاه آنالایزر MININEPH و برای سنجش مقدار لیزوزیم از روش بیان شده توسط Sahoo و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده گردید. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway Anova) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر، آزمون دانکن (Duncan) مورد استفاده قرار گرفت. در صورت نرمال نبودن داده‌ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون Kruskal Wallis و به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودارها، نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج

بر اساس نتایج میزان گلبول‌های سفید خون بچه‌ماهیان به ترتیب در تیمار ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت، بیش‌تر از تیمار ۳ و شاهد بود و در تیمار ۱ به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها مشاهده گردید ($P<0/05$)، گلبول‌های

قرمز در تیمار ۱ و ۲ بیش‌تر از تیمار ۳ و شاهد بود و اختلاف معنی‌دار در تیمار ۱ با تیمار ۳ و شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، هموگلوبین تیمار شاهد از کم‌ترین میزان برخوردار بود و میزان این عامل در تیمار ۱ بیش‌تر از سایر تیمارها بوده است و تیمار ۱ اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵)، هماتوکریت تیمار شاهد از کم‌ترین میزان برخوردار بود و میزان این عامل در تیمار ۱ بیش‌تر از سایر تیمارها بوده است و بین تیمار ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، از نظر حجم متوسط گلبولی بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) تیمار شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان در تیمار ۲ و ۳ مشاهده شد و اختلاف معنی‌دار با شاهد وجود داشت (P<۰/۰۵)، مقدار نوتروفیل در تیمار ۱ بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵)، لنفوسیت در تیمار شاهد بیش‌تر از سایر تیمارها بود و کم‌ترین میزان لنفوسیت در خون بچه ماهیان تیمار ۱ مشاهده گردید و اختلاف معنی‌دار با شاهد و تیمار ۲ و۱ وجود داشت (P<۰/۰۵)، مقدار مونوسیت در شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان مونوسیت در خون بچه‌ماهیان تیمار ۲ مشاهده شد و اختلاف معنی‌دار با شاهد، تیمار ۱ و ۳ مشاهده گردید(P<۰/۰۵)، از نظر میزان ائوزینوفیل بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما میزان این عامل در تیمار ۱ و ۲ بیش از سایر تیمارها بود (جدول ۱).

جدول ۱: تاثیر باکتری انتروکوکوس فیکالیس بر روی فاکتورهای خونی بچه تاسماهیان ایرانی

| فاکتور های خونی | شاهد (CFU ۰) | تیمار۱ (CFU $۱۰^{۷}$) | تیمار ۲ (CFU $۱۰^{۸}$) | تیمار۳ (CFU $۱۰^{۹}$) |
|---|---|---|---|---|
| گلبول‌های سفید | ۹۱۲۵ ± ۶۰۸ /۷۹ [a] | ۱۳۴۰۰ ±۶۳۶ /۳۹ [c] | ۱۰۹۵۰ ±۴۴۰/۶۴ [b] | ۱۰۲۰۰ ±۳۶۵/۱۵ [ab] |
| گلبول‌های قرمز | ۷۰۵۷۵۰ ±۲۳۶۵۵/۰۷ [a] | ۸۸۳۵۰۰ ±۵۱۳۴۶/۰۵ [b] | ۷۸۸۸۷۵۰ ±۱۱۱۱۵/۸۷ [ab] | ۷۷۰۷۵۰ ± ۳۵۰۵۳/۲۳ [a] |
| هموگلوبین | ۳/۹ ±۰/۱۵ [a] | ۴/۹۵ ±۰/۲۹ [b] | ۴/۴۳ ±۰/۰۶ [ab] | ۴/۳۵ ±۰/۲۱ [ab] |
| هماتوکریت | ۲۰/۲۵ ±۰/۸۵ [a] | ۲۴/۷۵ ±۱/۰۳ [b] | ۲۳ ±۰/۴۱ [ab] | ۲۲/۷۵ ± ۱/۱۰ [ab] |
| حجم متوسط گلبولی | ۲۸۶/۲۵ ± ۳/۰۹ [a] | ۲۸۰/۷۵ ±۵/۴۵ [a] | ۲۹۱/۵۰ ± ۴/۳۳ [a] | ۲۹۴/۵ ± ۳/۳۳ [a] |
| غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز | ۵۵ ± ۰ /۴۰ [a] | ۵۵/۷۵ ± ۰/۲۵ [ab] | ۵۶ ± ۰ [b] | ۵۶/۲۵ ± ۰/۲۵ [b] |
| نوتروفیل | ۲۴/۵۰ ± ۰ /۶۵ [a] | ۴۱ ± ۰ /۷۰ [b] | ۲۴/۲۵ ± ۴/۹۲ [a] | ۱۹ ± ۰/۴۰ [a] |
| لینفوسیت | ۷۱/۲۵ ± ۱ /۷۵ [d] | ۵۲/۵ ±۱/۲۶ [a] | ۵۵/۵ ±۰/۶۴ [b] | ۶۴ ± ۰/۵۸ [c] |
| مونوسیت | ۳/۵ ± ۰ /۲۹ [a] | ۴/۷۵ ±۰/۴۸ [b] | ۵ ±۰/۴۰ [c] | ۳/۷۵ ± ۰/۴۷ [d] |
| ائوزینوفیل | ۱ ± ۰ [a] | ۱/۷۵ ±۰/۲۵ [a] | ۱/۵۰ ±۰/۲۹ [a] | ۱/۳۳ ± ۰/۳۳ [a] |

لیزوزیم شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و در کلیه تیمارها افزایش یافته و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، IGM شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان IGM از نظر عددی در خون بچه‌ماهیان در تیمار ۱ مشاهده شد و در کلیه تیمارها افزایش داشته و اختلاف معنی‌دار مشاهده

گردید (P<۰/۰۵)، از نظر ALP بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، مقدار ALT بین تیمار ۲ با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری نشان داد (P<۰/۰۵)، در تیمار شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان ALT در خون بچه‌ماهیان در تیمار ۲ مشاهده شد به‌طور کلی در تیمارها ALT افزایش یافت، AST در تیمار شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان AST در خون بچه ماهیان در تیمار ۲ مشاهده شد و در تیمارها افزایش یافته و به لحاظ آماری تیمار ۲ با شاهد و تیمار ۳ اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲: تاثیر باکتری انتروکوکوس فیکالیس بر روی آنزیم های ایمنی و کبدی بچه تاسماهیان ایرانی

| فاکتورهای خونی | شاهد (CFU ۰) | تیمار۱ (CFU $۱۰^{۷}$) | تیمار ۲ (CFU $۱۰^{۸}$) | تیمار۳ (CFU $۱۰^{۹}$) |
|---|---|---|---|---|
| لیزوزیم | ۱۲ ± ۰ /۵۸ [a] | ۲۸ ±۱ [b] | ۲۵ ±۴/۰۴ [b] | ۲۸ ± ۲/۰۸ [b] |
| IGM | ۵ ±۰ /۵۷ [a] | ۲۳/۶۷ ±۳/۳۸ [b] | ۲۱/۳۳ ±۰/۸۸ [b] | ۲۳/۳۳ ±۱/۸۶ [b] |
| ALP | ۴۲۵/۶۷ ± ۴۲ /۳۸ [a] | ۳۲۱ ±۲۷/۰۲ [a] | ۳۷۳/۳۳ ±۴۵/۱۶ [a] | ۳۸۳ ± ۲۱/۴۵ [a] |
| ALT | ۲/۳۳ ±۰ /۳۳ [a] | ۳/۶۷ ±۰/۳۳ [ab] | ۴ ±۰/۵۷ [b] | ۳/۳۳ ±۰/۳۳ [ab] |
| AST | ۸۰ ±۱۴ /۶۴ [a] | ۱۱۷/۳۳ ±۷/۹۶ [ab] | ۱۵۸/۳۳ ±۲۸/۹۷ [b] | ۹۸/۶۷ ±۱/۷۶ [a] |

## بحث

شاخص‌های خونی به عنوان معیارهای فیزیولوژیکی در پاسخ به تغییرات خارجی یا داخلی در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cataldi *et al*., 1998). شاخص‌های خونی به‌طور عمده برای ارزیابی سلامت ماهیان (Bhaskar and Rao, 1985)، استرس محیطی، (Aldrin *et al*., 1982) تغذیه (Casillas and Smit, 1977)، جنس (Collazos *et al*., 1998)، اندازه ماهی (Garcia et al., 1992) و اختلافات فصلی و تخم‌ریزی نقش مهمی دارند. این عوامل بر تغییرات شاخص‌های خونی تاثیر دارند. تغییر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی در فصول مختلف، تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف و بیماری‌ها ثابت شده است (Aldrin *et al*., 1982). یکی از راه‌های تشخیص بیماری در ماهیان مطالعات خون شناسی است (Stoskopf, 1993). جهت کنترل وضعیت فیزیولوژی ماهیان از نقطه نظر رشد، بیماری و حتی باروری، ارزیابی شاخص‌های خونی در آنهاست (بهمنی، ۱۳۸۷). اصولا پارامترهای خونی نشانه‌ای از وضعیت فیزیولوژیک موجود بوده و می‌تواند تحت تاثیر مواد غذایی خورده شده توسط آن جانور باشد (Wagbo *et al*.,1998; Hemar *et* 1995; Kumar *et al*., 2005 ;Kinger *et al*., 1996 *al*., ;).

در مطالعه حاضر مشاهده گردید که در اکثر تیمارها مقادیر WBC، RBC، HB، MCH، نوتروفیل، ائوزنوفیل، گرانولوسیت و هماتوکریت به‌طور معنی‌داری از نمونه‌های شاهد بیش‌تر بوده ولی MCV (حجم متوسط گلبولی) تنها در تیمار ۲ و ۳ نسبت به شاهد افزایش داشته است اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد وجود نداشت. در مطالعه انجام شده توسط شناور و همکاران (۱۳۹۱) نتایج تغذیه بچه تاس

ماهیان ایرانی با مکمل *Lacto coccus lactis* در اکثر تیمارها مقادیر WBC، RBC، HB، MCH، نوتروفیل، ائوزنوفیل وگرانولوسیت به‌طورمعنی‌داری از نمونه‌های شاهد بیش‌تر بوده ولی هماتوکریت نسبت به شاهد کاهش داشته است که با نتایج حاضر همخوانی دارد فقط در مورد هماتوکریت و شاخص حجم متوسط گلبولی با هم تفاوت وجود دارندکه این اختلاف می تواند دلایل متعددی داشته باشد از جمله در ارتباط با گونه ماهی و ساختار ژنتیکی آنها، مدت و مقدار غذای حاوی پروبیوتیک، نوع و منشا پروبیوتیکی متفاوت باشد Nikoskelainen *et al*., 2003; Panigrahi *et al*., 2005; Salinas *et al*., 2005; Kim and Austin, 2006; Pieters *et al*., 2008; Son *et al*., 2009 همچنین در مطالعه انجام شده توسط دلسوز خاکی و همکاران، ۱۳۹۲ نتایج تغذیه بچه تاسماهیان سیبری با مکمل باکتوسل و اسید فولیک در اکثر تیمارها مقادیر WBC، RBC، HB، MCH،MCV نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت به جز ائوزینوفیل در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ولی هماتوکریت نسبت به شاهد کاهش داشت. همانطور که ملاحظه می-گردد این نتایج نیز تقریبا با نتایج ما مطابقت دارد. برخی عوامل سلولی از قبیل فاگوسیتوزیس گلبول‌های سفید (Jones *et al*., 1993) و فعالیت لنفوسیت‌ها ( Jones *et al*., 1993; Siwiki *et al*., 1993) نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهی‌ها ایفا می‌کنند. پارامترهای هماتولوژی شاخص خوبی برای ارزیابی سلامت ماهی هستند و نشان داده شده است که این پارامترها به‌وسیله مصرف پروبیوتیک‌ها تحت تاثیر قرار می گیرند ( Irianto and Austin, 2002a. ; Brunt and Austin, 2005).

در این بررسی افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۱ و ۲ مشاهده گردید که می‌تواند نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی در تاسماهیان محسوب شود، زیرا لکوسیت‌ها ازمنابع اصلی تولید لیزوزیم به شمار می‌روند (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰). از نظر گلبول‌های قرمز نیز دقیقا مثل گلبول‌های سفید بود که نشان دهنده تاثیرپروبیوتیک انتروکوکوس فیکالیس در بهبود اکسیژن رسانی به بافت‌ها و فرایند سوخت و ساز و انتقال $CO_2$ از بافت‌ها به بیرون بدن می باشد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹) از آنجایی که هموگلوبین پروتئینی است که ۹۵ درصد گلبول قرمز را تشکیل می دهد، نتایج هموگلوبین با گلبول قرمز مطابقت دارد (Welker *et al*., 2007) هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. روند افزایش هموگلوبین مانند گلبول قرمز در تیمارها و شاهد بود که این امر بیان کننده وضعیت تنفسی مناسب تر در تیمار ۱ و تا حدی تیمار ۲ نسبت به شاهد و تیمار ۳ بود. میزان هماتوکریت در تیمار شاهد دارای کم‌ترین میزان و اختلاف معنی‌دار آماری با تیمارهای دریافت کننده باکتری انتروکوکوس بود که می‌توان اذعان داشت که مواد محرک ایمنی می‌توانند اثر معنی‌داری بر شاخص‌های هماتولوژیک داشته باشد ( Tangestani *et al*., 2011). تفاوت در هماتوکریت ممکن است بخاطر تفاوت در گونه ماهی، اندازه، نوع غذا و مدت مطالعه باشد (Al-Dohail *et al*., 2009). شاخص یاخته های قرمز برای توصیف اندازه یاخته‌ها و میزان هموگلوبین آنها بکار رفته و از شمارش یاخته‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت بدست می آید (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). هاشمی منفرد (۱۳۹۳) بیان کرد که پارامترهای خونی از جمله RBC،WBC

، Hb، MCV و HTC با استفاده از پروبیوتیک ویسلا سیبریا بر روی تاسماهی سیبری افزایش معنی‌داری را نشان داد که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی دارد و اثرات مثبت باکتری‌های اسید لاکتیک را بر روی پارامترهای خونی تایید می‌کند البته مواردی نیز گزارش گردیده که این باکتری‌ها اثرات خاصی بر روی فاکتورهای خونی ندارند (Aly *et al*., 2008b). تعداد کل گلبول‌های سفید در رژیم غذایی پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. نتایج بررسی شده توسط Hosseinifar و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از مکمل‌های غذایی پروبیوتیکی مخمر ساکارومایسیس سرویزیه بر روی فیل‌ماهی جوان نشان داد که پارامترهای خون‌شناسی (تعداد اریتروسیت ها، هموگلوبین، هماتوکریت،MCHC، MCH،MCV، تعداد گلبول‌های سفید مختلف، گلوکز سرم یا سطوح پروتئینی کل سرم) و شیمیایی سرم اثر معنی‌داری توسط مخمرهای غذایی نداشت که با نتایج این مطالعه تفاوت دارد. تفاوت‌ها در پارامترهای خونی می تواند به خاطر گونه، اندازه، رژیم غذایی و مدت زمان مطالعه باشد. Merrifield و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی اثر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) پرداختند، آنها به این نتیجه رسیدند که این پروبیوتیک هیچ گونه تاثیری بر میزان هماتوکریت این ماهی نداشت (Merrifield *et al*., 2011). نتایج مطالعه مصلحی (۱۳۹۳) نشان داد که استفاده از پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس در فاکتورهای خونی تاسماهی سیبری بهبود ایجاد کرد یعنی باعث افزایش معنی‌دار گلبول‌های سفید شد همچنین گلبول‌های قرمز خون و هموگلوبین را به‌طور معنی‌داری افزایش داد، هماتوکریت نیز افزایش داشت اما میزان آن معنی‌دار نبود، که این نتایج با یافته‌های حاصل از این تحقیق همخوانی دارد از آنجا که پروبیوتیک‌ها باعث بهبود عملکرد سیستم‌های ایمنی بدن می شود، بنابراین سلول‌ها و بافت‌ها نیاز به اکسیژن بیش‌تری دارند که در نتیجه آن گلبول‌های قرمز بیش‌تری تولید می‌شود در نتیجه هماتوکریت و هموگلوبین افزایش می‌یابد. در رابطه با سطوح هماتوکریت خون نتایج متضادی وجود دارد، برخی تحقیقات نشان داد که استفاده از پروبیوتیک باعث افزایش سطوح هماتوکریت می شود (Aly *et al*., 2008a)، برخی دیگر بیان کردند که پروبیوتیک‌ها باعث کاهش سطوح هماتوکریت خون می شوند (Abd El Rhamn *et al*., 2009)، برخی دیگر گزارش کردند که پروبیوتیک‌ها هیچ گونه تاثیری بر سطوح هماتوکریت ندارند (Aly *et al*., 2008b)، Merrifield و همکاران(۲۰۱۰) بیان کردند که دلایل این تناقض‌ها هنوز به وضوح روشن نیست.

لیزوزیم یکی از فاکتورهای مورد بررسی جهت دست‌یابی به شرایط سیستم ایمنی می‌باشد. این آنزیم به دنبال تزریق فرآورده‌های میکروبی در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و جیره غنی با پروبیوتیک در سرم ماهیان افزایش می‌یابد (توکمه‌چی، ۱۳۸۶). اگرچه لیزوزیم یکی از ده‌ها فاکتور قابل بررسی برای ارزیابی وضعیت سلامت آبزیان در جهت ایمنی ذاتی محسوب می شود اما در سال‌های اخیر میزان لیزوزیم موجود در خون و بافت نیز فاکتوری مناسب برای ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس‌زا محسوب شده و در ماهیان بسیار فعال‌تر از مهره‌داران عالی‌تر است (Kim and Austin, 2006). برخی از باکتری‌ها قادرند به‌طور مستقیم به وسیله

لیزوزیم لیز شوند، اما در بسیاری موارد غشای سلولی باکتری‌ها ابتدا مورد حمله کمپلمان واقع شده تا لیزوزیم اثرات خود را القا نماید (Fevolden *et al*., 2002). نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که لیزوزیم سرم در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک انتروکوکوس فیکالیس بیش‌تر از تیمار کنترل بوده و اختلاف معنی‌دار آماری در پایان دوره پرورش با شاهد مشاهده گردید. در همین خصوص دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران در سال۲۰۰۷، Newaj-Fyzul و همکاران در سال۲۰۰۷، Salah Mesalhy (۲۰۰۸)، توکلی و اخلاقی(۱۳۸۸)، Austin و Sharifuzzaman (۲۰۰۹)، Naseri و هکاران (۲۰۱۳) و Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. در مطالعه شناور(۱۳۹۱) ، میزان لیزوزیم سرم افزایش یافت و در تیمار سوم نسبت به کنترل دارای اختلاف معنی‌دار آماری بوده است. همچنین در مطالعه هاشمی‌منفرد(۱۳۹۳) لیزوزیم و IgM افزایش معنی‌داری را در تاسماهی سیبری نشان داده است که نتایج ما را تایید می‌کند. با توجه به نتایج فوق ملاحظه می‌گردد که پروبیوتیک انتروکوکوس فیکالیس باعث افزایش لیزوزیم گردیده که این افزایش به مقاومت ماهی در هنگام مواجهه با پاتوژن کمک می‌کند. نقش لیزوزیم در عفونت به‌عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آنها و همچنین تحریک فاگوسیتوزمی باشد (Newaj-Fyzul *et al*., 2007) مقادیر آنزیم لیزوزیم بویژه، در سرم خون منعکس کننده سلول‌های فاگوسیتوزکننده می باشند (Pirarat *et al*., 2006). بنابراین به‌طور مستقیم می‌توان تقویت سیستم ایمنی در بچه تاس‌ماهیان ایرانی را در نتیجه افزایش این آنزیم در تیمارهای مربوط به انتروکوکوس دانست. اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی (از جمله افزایش فعالیت لیزوزیم سرم) می‌شود (Merrifield *et al*., 2009; Pourgholam *et al*., 2017; Zare *et a*l., 2017; Liu *et al*., 2010). مصلحی (۱۳۹۳) نشان داد میزان لیزوزیم در تیمارها افزایش داشت اما این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود.

در تحقیق حاضر IgM به عنوان یک فاکتور ایمنی اختصاصی نیز مورد بررسی قرار گرفت نقش‌های حفاظتی آنتی‌بادی‌ها شامل خنثی سازی ویروسی، کشتن و چسبیدن به باکتری‌ها، فعالیت سیستم کمپلمان و تسهیل نمودن بلع پاتوژن‌ها می‌شود. علاوه بر پاسخ ایمنی اختصاصی، سطوح نسبی آنتی‌بادی‌های طبیعی در سرم اغلب ماهیان دیده شده است (Magnadottir, 1998) در این بررسی IgM خون بچه ماهیان در تیمار شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بوده است و بیش‌ترین میزان IgM در خون بچه ماهیان در تیمار ۱ مشاهده شده است و در کلیه تیمارها افزایش یافته و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید و در تعدادی از مطالعات نشان داده شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک نیز سبب افزایش ایمنوگلوبولین‌ها شده‌اند (Panigrahi *et al*., 2004)، در مطالعه شناور (۱۳۹۱) میزان ایمنوگلوبولین IgM به طورغیر معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش داشته است. ایمنوگلوبولین‌های سرم ترکیب اصلی سیستم ایمنی هومورال بوده و IgM ایمنوگلوبولین اصلی در ماهی است (Wilson *et al*., 1995) همچنین دلسوز خاکی(۱۳۹۱) بیان نمود میزان لنفوسیت‌ها، کل Ig و ایمنوگلوبین M (IgM) بین تیمارها و شاهد بچه ماهیان شیپ اختلاف معنی‌دار

آماری دیده شد. در بررسی دیگر (هاشمی منفرد، ۱۳۹۳) IgM افزایش معنی‌دار آماری نشان داد، در مطالعات قبلی ذکر شده است که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند تولید ایمنوگلوبولین را در ماهی‌ها تحریک کنند (Nayak *et al*., 2007; Panigrahi *et al*., 2005; Modaberi *et al*., 2014; Jafarzadeh *et al*., 2015; Nikoskelainen *et al*., 2003). در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۰) سطح IgM سرم در تیمارهای تغذیه ای حاوی *Bacillus pumilus* و *Bacillus clausii* پس از ۳۰ روز بیش‌تر بوده ولی پس از ۶۰ روز نسبت به کنترل کاهش داشته است. ولی در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که در انتهای ۶۰ روز تغذیه تاسماهی ایرانی با *E.feacalis* سطح IgM همچنان نسبت به کنترل بیش‌تر بوده است که می توان از تاثیر مثبت این باکتری بر ایمنی هومولار برشمرد. آنزیم های ALT ، AST ، ALP از آنزیم‌های مهم در تعیین وضعیت سلامت ماهیان به‌شمار می‌آیند، سلول‌های کبدی غنی از این آنزیم‌ها بوده و LDH نیز جهت بررسی آسیب‌های بافتی کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد، تغییرات آنزیم‌های سرمی در انواعی از بیماری‌ها، آلودگی‌های انگلی و مسمومیت‌ها گزارش شده (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج این تحقیق نشان داد میانگین ALT و AST در تیمارها افزایش جزئی داشته و فقط تیمار دوم $10^8$ نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود و تیمار ۱ و ۳ با کنترل اختلاف نداشتند اما از نظر میزان ALP اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت، در مطالعه شناور(۱۳۹۱) مقادیر ALT، AST، ALp در تیمارها نسبت به کنترل پایین‌تر بوده و اختلاف معنی‌دار نیز نداشت، کبد از لحاظ AST و ALT بسیار غنی بوده و آسیب کبدی باعث می شود که مقادیر این آنزیم‌ها در سرم بالا رود (Vaglio and Landtiscina, 1999)، بنابراین افزایش جزئی آنزیم‌های کبدی در تحقیق حاضر نشان دهنده عدم تاثیر سوء این باکتری بر کبد تاسماهی ایرانی بوده است.

در نهایت می توان گفت استفاده از *E. faecalis* بهبود معنی‌داری در فاکتورهای خونی و سرمی را نشان داد و با ارتقاء سیستم ایمنی و سلامت بچه تاسماهی ایرانی به عنوان یک پروبیوتیک پیشنهادی می‌تواند موثر باشد.

## سپاسگزاری

از کلیه اساتید و همکاران محترم که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را اعلام می‌داریم.

## منابع

۱. اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، احمدی، ا.، ۱۳۹۰. تاثیر پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۶ (۲)، ۱۳۶-۱۳۲ .

۲. بهمنی، م.، ۱۳۸۷. بررسی اکوفیزیولوزی استرس از طریق اثر بر محورهای HPI و HPG سیستم ایمنی و فرایند تولیدمثل در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). رساله دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.۲۷۷ ص.

۳. توکلی، ه.، اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دنبال عفونت

تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماری‌زا، مجله تحقیقات دامپزشکی، (۲)، ۱۶۲-۱۵۷.

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

۵. دلسوز خاکی، ن.، خارا، ح.، محسنی، م .، شناور ماسوله، ع. ر.، ۱۳۹۲. . بررسی اثرات پروبیوتیک باکتوسل و اسید فولیک بر روی فاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ. مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۶(۴)، ۱- ۱۳.

۶. شناور ماسوله، ع. ر.، ۱۳۹۱. شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک روده بچه تاسماهیان ایرانی ( *Acipenser persicus*) و کارایی آنها بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنوفیزیولوژی. پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته بهداشت آبزیان. دانشگاه تهران، ۱۴۰ صفحه.

۷. کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م.، ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. نشر بازرگان، ۱۹۴ صفحه.

۸. مصلحی، ف.، ۱۳۹۳. تاثیر باکتری پدیوکوکوس پنتاساسئوس بر فاکتورهای رشد و ایمنی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، ۹۸ صفحه.

۹. هاشمی منفرد، س. م.، ۱۳۹۳. مطالعه تاثیر باکتری ویسلا سیبریا بر فاکتورهای رشد و ایمنی در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، ۹۹ صفحه.

10. Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, 27, 175–180.
11. Aldrin, J.F, Messager, J.L., Laurencin, F.B., 1982. La Biochemi Cliniqu en Aquacalture. Enteret et Prespegtiv. CNEXO, Actes Collog, 14, 291-326.
12. 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. Aquaculture Research, 40, 1642-1652.
13. Aly, S.M., Abd-El-Rahman, A.M., John, G., Mohamed, M.F., 2008a. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. Aquaculture, 277, 1–6.
14. Aly, S.M., Ahmed, YA-G., Ghareeb, AA-A., Mohamed, M.F., 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol, 25, 128-136.
15. Aly, S.M., Mohamed, M.F., John, G., 2008c. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). Aqua Res., 39, 647-656.
16. Arijo, S., Brunt, J., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., Austin, B., 2008. Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against V. harveyi. Journal of Fish Diseases., 31, 579 – 590.
17. 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.
18. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L., 2006. Review.The role of probiotics in aquaculture.Veterinary Microbiology, 114,173–186.
19. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vandrell, D., Girones, O., Muzquiz, J.L., 2007. Enhancement of the immune response

and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunol. Med. Microbiol, 51, 185–193.

20. Bhaskar, B.R., Rao, K.S., 1985. Use of haematological parameters as diagnostic tools in determining the health of milkfish, *Chanos ebanos* (Forskal), in brackishwater culture. Aquaculture and Fisheries Management, 21, 125-129.
21. 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.
22. 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). Journal of Fish Diseases, 30 (10), 573–579.
23. Casillas, E., Smith, L.S.,1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (Salmo gairdneri). Journal of Fish Biology , 10, 481- 491.
24. 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.
25. Collazos, E.C., Ortega, E., Barriga , C., Rodrìguez, A.B.,1998. Seasonal variation in haematological parameters in male and female *Tinca tinca*. Molecular and Cellular Biochemistry. 183, 165–168.
26. Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against Photobacterium damselae subsp. piscicida. Aquaculture, 293, 16–21.
27. Fevolden, S., Roed, K.H., Fjalested, K.T., 2002. selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. Aquaculture, 205, 61-75.
28. Garcia de la Banda, I., Cherguini, O., 1992. Influencia dela adicion de bacteria lacticas enel coltivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) Bulletin Institution Oceanography, 8, 247-254
29. Hai, N.V., Buller, N., Fotedar, R., 2009. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). Aquaculture Research, 40(5), 590– 602.
30. Hemare, G.I., Sandnes, K., Lie, O., Waagbo, R., 1995. Blood chemistry and organ nutrient composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed graded amounts of wheat starch. Aquac. Nutr, 1, 37-42.
31. Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D. L., 2011. The effects of dietary inactive brewer,s yeast Sacch aromayces cereviciaevar. Ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenail beluga (*Huso huso*). Aquaculture 318: 90-94.
32. Irianto, A., Austin, B., 2002a. Probiotics in aquaculture: Reviews Journal of Fish Diseases, 25, 633-642.
33. Jafarzadeh, E., Khara, H., Ahmadnezhad, M. 2015. Effects of Synbiotic (Biomin imbo) on haematological and immunological components of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti*. Comparative Clinical Pathology. 24(6) 1317-1323.
34. 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.
35. Kim, D., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology, 21, 513-524
36. 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.
37. Kumar, R., Mukherjee, S.C., 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.
38. Liu, K.F., Chiu, Ch.H., Shiu, Y.L., Cheng, W., 2010. Effects of the probio, Bacillus subtilis E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish & Shellfish Immunology, 28, 837–844.
39. Magnadottir, B., 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. Icelandic Agricultural Sciences. 12: 47–59.
40. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth

probiotics bacteria, Lactobacillus rhamnosus JCM 1136. Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 379–388.

50. Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, 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.
51. Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., Lyndon, A.R., 2008. Efficacy of in- feed probiotics against *Aeromonas* bestiarum and *Ichthyopthirius multifiliis* skin infections in rainbow trut (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Jornal of Applied Microbiology, 105, 723-732.
52. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). VeterinImmunol Immunopat, 113, 339-347.
53. Pourgholam, M. A., Khara, K., Safari, R., Yazdani Sadati, M. A., Aramli, M. M. 2017. Influence of Lactobacillus plantarum Inclusion in the Diet of Siberian sturgeon (Acipenser baerii) on Performance and Hematological Parameters. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 17(1), 1-5.
54. Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S., 2008. Evaluations of *lactic acid bacteria* as probiotics for juvenile seabass Lates calcarifer. Aquaculture Research, 39(2), 134-143.
55. Sahoo, P.K., Mahapatra, K.D., Saha, J.N., Barat, A., Sahoo, M., Mohanty, B.R., Gjerde, B., odegard, J., Rye, M., Salte, R. 2008. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. Fish & Shellfish Immunology, 25, 163-169.
56. 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.
57. Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish & Shellfish Immunology, 19, 67-77.
58. Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2009. Influence of probiotic feeding duration on performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aqua. Nutr DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009. 00689.x.
41. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M., Ringo E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids- a Review. Aquaculture, 302, 1–18.
42. 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.
43. Modaberi, A., Azari Takami, Gh., Behmanesh, Sh., Khara, H. 2014. Effects of different levels of Probiotic, Bactocell on growth performance, intestinal microflora and environmental stress on Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). JOournal of Aquaculture Development. 7(4), 77/87.
44. Naseri, S., Khara, H., Shakoori, Sh. 2013. Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) frys. Journal of Applied Animal Research. 41(3), 318-325.
45. Nayak, S.K., Swain, P., Mukherjee, S.C., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish & Shellfish Immunology, 23, 892-896
46. Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective.review. Fish & Shellfish Immunology, 29, 2-14.
47. Newaj-Fyzul, A., Adesiyunz, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 103(5), 1699-1706.
48. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol, 15, 443-452.
49. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayshi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by a potential

65. Vaglio, A., Landtiscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost Sparus aurata in response to cadmium intoxication. Ecotoxicol Environ Saf., 43, 111-116.
66. Vazquez, J.A., Gonza´lez, M.P., Muradoet, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245, 149-161.
67. Waagbo, R.K., Sandnes and O. Lie, 1998. Effects of inositol supplementation on growth, chemical composition and blood chemistry in Atlantic salmon. *Salmo salar* L., fry. Aquac. Nutr., 4, 53-59.
68. Wang, Y.B., Xu, Z.R., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim. Feed Sci. Technol, 127, 283–292.
69. Walker, T.L., Lim, C., yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., Klesius, P.H., 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwarrdsiella ictaluri* challenge in channel cat fish, *Ictaluri punctatus*, fed diets containing commercial whol-cell yeast or yeast subcomponents. Journal of the World Aquaculture Society, 38, 24-35.
70. Wilson, M.R., van Ravenstein, E., Miller, N.W., Clemm, L.W., Middleton, D.L., Warr, G.W., 1995. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. Dev Comp Immunol 19, 153-164.
71. Zare, A., Azari Takami, Gh., Tari dashti, F., Khara, H. 2017. The effects of *Pediococcus acidilactici* as a probiotic on growth performance and survival rate of great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Iranian journal of fisheries science. 16(1) 150-161.

disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, 27, 440–445.
59. Siwicki, A.K., Dunier, M., 1993. Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* by ELISPOT assay after in vivo and in vitro immunization of rainbow trout (*oncorhynchusmykiss*). Vet fmmunof fmmunopathol, 37, 73-80.
60. Son, V.M., Chang, C., Wu, M., Guu, Y., Chiu, C., Cheng, W., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides. Fish & Shellfish Immunology, 26(5), 691–698.
61. Song, Z., Wu, T., Cai, L., Zhang. L., Zheng, X., 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricumon* the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. J Zhejiang Univ Sci B., 7(7), 596-602.
62. Stoskopf, M.K., 1993. Clinical Examination and Procedures; Surgery. In: Fish Medicine, ed. MK. 62-78, 91-97.
63. Sun, Y., Yang, H., Ma, R., Lin, W., 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, 29, 803-809
64. 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.