مطالعه اثرات پری‌بیوتیک ایمنواستر بر فاکتورهای بیومتریک با تأکید بر وزن و طول و تشخیص افتراقی لوکوسیت‌ها در بچه‌ماهیان انگشت‌قد ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*)

مریم آفتابگرد[۱،*]، عباسعلی زمینی[۱]، هادی ارشاد لنگرودی[۱] و نریمان میراعلمی[۲]

[۱] لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] رشت، آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی، کنترل کیفی و آنالیز مواد غذایی

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۸

چکیده

پری‌بیوتیک ایمنواستر در سطوح صفر، ۲ و ۴ درصد با هدف بررسی مشخصه‌های وزن و طول و تغییرپذیری لوکوسیت‌های خونی بچه‌ماهی سفید با وزن اولیّه ۰/۰۲± ۰/۳۵ گرم به مدت ۸ هفته مطالعه شد. آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب ۱ گروه شاهد و ۲ تیمار آزمایشی هر یک با ۳ تکرار و به تعداد ۱۵۰ عدد بچه‌ماهی در هر تانک انجام شد. غذادهی ۲۰-۱۵ درصد توده زنده متغیّر بود. در پایان آزمایش اگرچه میانگین وزنی و طولی بین شاهد و تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$)، امّا تفاوت مثبت و معنی‌داری در تشخیص افتراقی لوکوسیت‌ها مشاهده شد ($P \leq 0.01$). لذا، با افزایش - سطح ایمنواستر در جیره درصد لنفوسیت افزایش و بترتیب درصد مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل کاهش معنی‌داری یافت. بطوری که، سطح ایمنواستر ۴ درصد دارای بیشترین میزان لنفوسیت و کمترین مقدار مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل بود ($P \leq 0.01$). نتـایج حاصله مشخّص ساخت سطوح مورد مطالعه پری‌بیوتیک ایمنواستر تأثیر قابل توجّهی بر عملکرد رشدی در بچه-ماهیان سفید نداشته، درحالی که بعنوان یک محرّک ایمنی قادر است تأثیر مثبت و معنی‌داری را بر لوکوسیت‌های خون و افزایش راندمان لنفوسیت‌ها بعنوان یکی از شاخص‌های مهم ایمنی اختصاصی سلّولی ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: پری‌بیوتیک ایمنواستر، بیومتریک، لوکوسیت‌ها، ماهی سفید (*Rutilus kutum*)

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۴۴۰۸۵۵، پست الکترونیکی: maryam.aftabgard86@gmail.com

مقدمه

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) گونه‌ای منحصر بفرد، بومی و دارای ارزش اکولوژیکی، اقتصادی و غذایی فراوان می‌باشد (۳) که در سال‌های اخیر بدلیل صید بی رویه، افزایش آلودگی‌ها، تخریب بستر رودخانه‌ها، عدم امنیّت جهت مهاجرت و... نسل‌شان کاهش یافته (۶)، با توجّه به موارد ذکر شده در سال‌های اخیر شیلات ایران از طریق احداث کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی در استان-های شمالی کشور برای تجدید نسل این گونه و با هدف بازسازی در حفظ ذخایر دریای خزر، اقدام به تکثیر و پرورش و سپس رهاسازی میلیونها قطعه بچه‌ماهی سفید با وزن حدود ۱ گرم به رودخانه‌های منتهی به حوزه جنوبی دریای خزر نمود؛ بدین منظور تغذیه مصنوعی بچه‌ماهیان سفید یکی از مهمترین عوامل موفقیت در امر بازسازی ذخایر می‌باشد.

در راستای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک در فلور باکتریایی روده ماهی و میگو در دهۀ اخیر و مشخص شدن نقش آنها در سلامتی و رشد میزبان، تحقیقـات به سمـت معرّفی مکمّل‌هایی در این زمینه سوق داده شد (۱۲،

Archive of SID
www.SID.ir

۱۳و۱۴)، که از جمله این مکمّل‌ها می‌توان به پری‌بیوتیک اشاره کرد. پری‌بیوتیک‌ها عناصر غذایی غیر قابل‌هضمی هستند که از طریق تحریک رشد یا فعّال کردن یک یا تعداد محدودی از گونه‌های باکتریایی که در روده وجود دارند اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می‌بخشند (۹).

یکی از شاخص‌های مهم و قابل‌اطمینان در بررسی وضعیّت سلامتی و فیزیولوژی ماهیان سنجش پارامترهای خون آنان بوده که تحت تأثیر تغذیه، عوامل محیطی و سن می‌باشد. بنابراین برای مقایسه رژیم‌های متفاوت غذایی بر سلامت و سیستم دفاعی می‌توان شاخص‌های خونی را مورد بررسی قرارداد (۱۶). اهمیّت خون‌شناسی امروزه به حدّی رسیده که در رهاسازی بچه‌ماهیان استخوانی و خاویاری بجای استفاده از شاخص‌های بیولوژیک (وزن و طول) می‌توان از شاخص‌های هماتولوژیک استفاده نمود، زیرا اختلال در هر بافتی از بدن ماهی در خون نمودار می‌شود.

در رابطه با برخی تحقیقات انجام گرفته در زمینه تأثیر ترکیبات پری‌بیوتیک در ماهیان می‌توان به مواردی نظیر تأثیر منفی اینولین بر عملکرد ایمنی در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) (۷)، عملکرد مثبت پارامترهای رشد و ایمنی غیراختصاصی تحت تأثیر پری‌بیوتیک Bio-MOS® در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۲) و کپورمعمولی (۲۳) و ماهی باس جوان دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (۲۶)، افزایش مقاومت در برابر باکتری*F.columnar* در گونه *Notemigonus crysoleucas* تحت تأثیر پری‌بیوتیک Grobiotic®-AE (۲۰ و ۲۱)، روند افزایش رشد با افزودن پری‌بیوتیک XOS به جیره‌غذایی ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) (۲۸)، تأثیر اینولین جیره غذایی بر فاکتورهای هماتولوژیک و میزان فعّالیت آنزیم‌های سرم خون در فیل‌ماهیان جوان پرورشی (۱)، تأثیر مثبت اینولین بر تحریک سیستم ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری بیماریزای استرپتوکوک (۴) و تأثیر دو پری-بیوتیک ایمنووال و ایمنواستر بر روند افزایش رشد و فاکتورهای خونی در فیل‌ماهیان جوان پرورشی (*Huso huso*) (۲۴ و ۲۵) اشاره نمود.

با توجّه به اثرات مثبت پری‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، تحقیق حاضر با هدف بررسی افزودن پری‌بیوتیک تجاری ایمنواستر در جیره غذایی بر میزان تأثیرپذیری پارامترهای - کمّی رشد با تأکید بر میانگین‌های وزن و طول جهت دستیابی به میزان بالاتری از بیوماس (زی‌توده) بچه‌ماهیان - سفید بمنظور رهاسازی و تحریک شاخص‌های خونی از طریق تأثیر بر لوکوسیت‌های افتراقی بعنوان شاخص سیستم ایمنی و تولید بچه‌ماهیان سفید مقاوم در برابر عوامل نامساعد محیطی در شرایط تراکم بالا در استخرهای خاکی پرورش تا رسیدن به وزن رهاسازی (۱ گرم) صورت-گرفت.

مواد و روشها

ماهی: در این بررسی ۱۳۵۰ عدد بچه‌ماهی سفید با وزن متوسّط ۰/۰۲±۰/۳۵ گرم از استخرهای خاکی به محل آزمایش واقع در سالن پرورش کارگاه تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت منتقل شده و به ۹ تانک فایبرگلاس پرورشی به ابعاد ۰/۴×۲×۲ متر و به حجم آبگیری ۲۰۰۰ لیتر و به تعداد ۱۵۰ عدد در هر تانک معرفی شدند.

غذا و غذادهی : پری‌بیوتیک ایمنـواستر در دو سطح ۲ و ۴ درصد به غذای کنستانتره آغازین بچه‌ماهی سفید (S.F.K) (غذای پودری رایج بچه‌ماهیان سفید در کارگاه تکثیر و پرورش شهید انصاری رشت) اضافه شده و در سه تکرار به بچه‌ماهیان داده شد. ایمنواستر محصول کشور استرالیا بوده و نماینده انحصاری آن در ایران شرکت شفـق داروی پارسیان است. این مادّه محرّک سیستم ایمنی در آبزیان می‌باشد و براساس خاصیّت تحریک‌کنندگی بتاگلوکان‌های مشتق شده از دیوارهٔ سلولی مخمّر

Archive of SID
www.SID.ir

Saccharomyces cerevisiae عمل می‌کند. ترکیب این پری‌بیوتیک حاوی: ۲۰٪ β-1,3- Glucan، ۱۹٪ کربوهیدرات مانان اولیگوساکارید (MOS) (ترکیبی که منبع تغذیه‌ای مناسب برای رشد و فعالیّت باکتریهای فلور دستگاه - گـوارش (لاکتوباسیل‌ها و سایر باکتریها) می‌باشد و از جایگزینی و اشغال سلول‌های روده‌ای توسّط باکتری‌های بیماریزا جلوگیری‌می‌کند)، ۳۲٪ پروتئین، ۸٪ خاکستر خام، ۳٪ فسفر، ۲٪ سدیم، ۱/۴٪ فیبر و ۰/۸٪ کلسیم و غیره می- باشد. اجزاء بیوشیمیایی جیره پایه بچه‌ماهی سفید (S.F.K) نیز عبارتند از: کربوهیدرات ۱۷/۷٪، رطوبت ۸/۱٪، خاکستر ۱۶/۷٪، پروتئین ۲۱٪، مواد ازته فرار ۲۱٪، فیبر خام ۶٪ و چربی ۹/۵٪.

در این مطالعه بچه‌ماهیان سفید بر اساس ۲۰-۱۵ درصد بیوماس با توجّه به دمای آب و وجود یا عدم وجود مواد غذایی باقیمانده در ظروف غذا، روزانه سه وعده (ساعات ۹، ۱۳ و ۱۷) بمدّت ۸ هفته مورد تغذیه قرار گرفتند. در طول دورهٔ آزمایش بمنظور زیست‌سنجی هر ۱۵ روز یکبار از هر تانک به تعداد ۲۰ عدد بچه‌ماهی بصورت تصادفی نمونه‌برداری شد و بعد از بیهوشی با عصاره گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بوسیله ترازوی دیجیتال با دقّت ۰/۰۰۱ گرم برای سنجش وزن و کولیس با دقّت ۰/۰۱ میلی‌متر برای سنجش طول اندازه‌گیری و ثبت شد. ضمناً فاکتورهای کیفی آب در طول دورهٔ پرورش مورد اندازه- گیری و سنجش قرار گرفت. دمای آب طی ۸ هفتـه ۲۲/۸۶±۰/۴۸ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول ۶/۸۹±۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر و دامنه pH آب ۷/۶۸±۰/۰۳ بود.

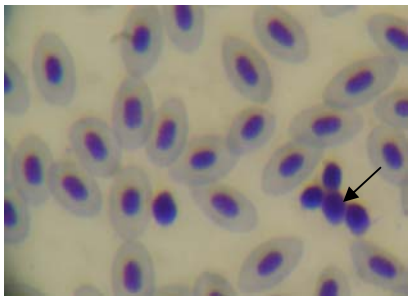
خونگیری از بچه‌ماهیان سفید: نمونه‌گیری از بچه‌ماهیان سفید جهت تهیّه گسترش خونی و شمارش افتراقی لوکوسیت‌ها در انتهای دورهٔ پرورش صورت گرفت. بدین منظور ۳۰ عدد بچه‌ماهی از هر تیمار بطور تصادفی انتخاب شدند. برای خونگیری ابتدا با پارچه یا توری تمیز بدن بچه‌ماهی را خشک کرده تا رطوبت سطح بدن تأثیری روی نمونه برداشت شده نداشته باشد، سپس با قطع ساقه دمی از طریق ورید دمی به میزان مورد نظر خون بچه‌ماهی خارج گردید.

تهیّه گسترش خونی و شمارش افتراقی لوکوسیت‌ها: برای تهیّه گسترش خونی جهت شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون (لوکوسیت ها) از روش دولامی (گوه‌ای) استفاده شد. به این ترتیب یک قطره خون در انتهای لام شیشه‌ای چکانده و بوسیله لام دیگر با زاویه‌ای در حدود ۳۰ تا ۴۵ درجه با قطرهٔ خون، از هر تیمار ۳۰ عدد گسترش تهیّه شد. سپس با استفاده از متانول گسترش بدست آمده فیکس گردید و با گیمسا با رقّت ۲۰٪ رنگ‌آمیزی انجام - شد. جهت بررسی مورفولوژیکی لوکوسیت‌ها با ریختن یک قطره روغن ایمرسیون روی قسمت نازکتر گسترش، ۱۰۰ عدد گلبول سفید شامل: لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل با بزرگنمایی۱۰۰ میکروسکوپ (شکـل ۴ - ۱) شمارش شده و تعداد هر نوع لوکوسیت بصورت درصد بیان گردید (۵).

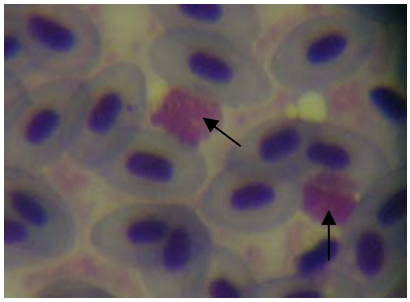
آنالیز آماری: ابتدا کنترل نرمال بودن پراکنش داده ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov Z بررسی شد. بر اساس شاخص‌های مورد نظر جهت بررسی میانگین‌های وزن، طول و درصد لوکوسیت‌های افتراقی بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده گردید و در صورت مشاهده اختلاف بین داده‌ها جهت مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) برای تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف موجود در سطوح خطای ۱ و ۵ درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (Ver 15.0) انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نمایی از لنفوسیت‌های بچه‌ماهی سفید



شکل ۲- نمایی از مونوسیت‌های بچه‌ماهی سفید

شکل ۳- نمایی از نوتروفیل بچه‌ماهی سفید

شکل ۴- نمایی از ائوزینوفیل بچه‌ماهی سفید

جدول ۱- مقایسه میانگین پارامترهای وزن و طول بچه‌ماهیان سفید در آغازین و آخرین بیومتری

پارامترهای وزن و طول	تیمار		
	شاهد	ایمنواستر ۲٪	ایمنواستر ۴٪
وزن اولیه (گرم)	۰/۳۴±۰/۰۲ a	۰/۳۶±۰/۰۲ a	۰/۳۴±۰/۰۲ a
وزن نهایی (گرم)	۱/۰۰±۰/۰۶ a	۱/۱۰±۰/۰۶ a	۱/۱۸±۰/۰۶ a
طول استانداردداولیه (میلی‌متر)	۲۹/۹۶±۰/۳۸ a	۳۰/۲۱±۰/۳۹ a	۲۹/۷۶±۰/۳۶ a
طول استانداردنهایی (میلی‌متر)	۴۲/۰۴±۰/۷۶ a	۴۲/۹۲±۰/۷۶ a	۴۳/۷۲±۰/۷۴ a
طول چنگالی اولیه (میلی‌متر)	۳۳/۱۰±۰/۴۰ a	۳۳/۲۴±۰/۳۸ a	۳۲/۹۷±۰/۴۱ a
طول چنگالی نهایی (میلی‌متر)	۴۵/۸۵±۰/۸۴ a	۴۶/۹۲±۰/۸۵ a	۴۷/۷۶±۰/۷۵ a
طول کل اولیه (میلی‌متر)	۳۶/۱۶±۰/۴۴ a	۳۶/۵۲±۰/۴۵ a	۳۵/۸۷±۰/۴۷ a
طول کل نهایی (میلی‌متر)	۵۰/۲۸±۰/۹۱ a	۵۱/۲۸±۰/۹۴ a	۵۲/۴۴±۰/۸۵ a
بیوماس (زی‌توده) اولیه (گرم)	۵۱±۸/۰۷ a	۵۴±۹/۰۲ a	۵۱±۸/۰۵ a
بیوماس(زی‌توده) نهایی (گرم)	۱۴۷±۶/۵۵ a	۱۵۱/۴±۶/۴۷ a	۱۵۴/۱±۶/۱۳ a

حروف مشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P > 0.05$).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بچه ماهیان سفید تیمارهای مختلف

شاخص (درصد) / تیمار	شاهد	ایمنواستر ۲٪	ایمنواستر ۴٪
لنفوسیت	۴۸/۵۵±۱/۵۱ [a]	۵۵/۷۰±۰/۶۶ [b]	۶۹/۷۰±۱/۷۴ [c]
مونوسیت	۴۳/۵۵±۱/۴۶ [c]	۳۸/۳۷±۰/۷۲ [b]	۲۷/۶۰±۱/۷۵ [a]
نوتروفیل	۴/۶۰±۰/۴۰ [c]	۳/۱۰±۰/۲۹ [b]	۱/۴۷±۰/۰۹ [a]
ائوزینوفیل	۳/۳۰±۰/۳۴ [b]	۲/۸۳±۰/۱۷ [b]	۱/۲۳±۰/۰۸ [a]

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.01$).

نتایج

پارامترهای وزنی و طولی: در پایان دورهٔ پرورش اگرچه با توجّه به آزمونهای آماری ANOVA و Duncan از نظر میانگین وزن و طول بچه ماهیان بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$)، امّا داده‌های ذیل (جدول۱) نشان می‌دهد بچه‌ماهیان سفید تیمارهای آزمایشی بویژه تیمار ایمنواستر ۴ درصد نسبت به گروه شاهد از روند افزایش رشد نسبتاً بهتری برخوردار می باشند.

مقایسه افتراقی لوکوسیت‌ها: نتایج شمارش افتراقی گلبولهای‌سفید خون در گروه‌های آزمایشی و شاهد در جدول (۲) نشان داده شده است. بطوریکه مقادیر لنفوسیت (بر حسب درصد) در هر دو تیمار آزمایشی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0.01$)، و بترتیب مقادیر مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل (بر حسب درصد) لوکوسیت‌های خون بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده با هر دو سطح ۲ و ۴ درصد ایمنواستر نسبت به شاهد از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P \leq 0.01$).

بحث

علیرغم جدید بودن ایده بکارگیری ترکیبات مختلف پری-بیوتیک در جیره غذایی آبزیان، بیشتر بررسیها نشان‌دهندهٔ این است که پری‌بیوتیک‌ها دارای اثرات مثبت و مناسبی بر روند رشد و نمو، عملکرد فیزیولوژیک و دفاعی بدن آبزیان در شرایط و مراحل مختلف زیستی می‌باشند.

نتایج این مطالعه بیانگر این بود که در پایان دوره پرورش بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میانگین وزن و طول - بدن بچه‌ماهیان اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت (P 0.05 >)، با مراجعه به جدول (۱) مشاهده می‌گردد که بچه‌ماهیانی که با جیره حاوی سطوح ۲ و ۴ درصد پری-بیوتیک ایمنواستر تغذیه شدند از نظر مشخصه‌های وزنی و طولی (طول استاندارد، طول چنگالی، طول کل و وزن) نسبت به گروه شاهد روند افزایشی را نشان دادند و با افزایش دوز ایمنواستر در جیره وزن و طول افزایش یافت بطوری که بیشترین افزایش در سطح ایمنواستر ۴ درصد مشاهده شد. هر چند این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). میزان وزن توده زنده (بیوماس) نیز در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد بالاتر بوده و بیشترین افزایش بیوماس بدون تفاوت معنی‌دار آماری در تیمار ایمنواستر ۴ درصد مشاهده گردید ($P > 0.05$).

در این راستا بررسی مطالعات در خصوص میزان تأثیرپذیری خصوصیّات مورفولوژیکی بویژه میانگین وزنی و طولی در ماهیان تغذیه شده با ترکیبات پری‌بیوتیک نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. در اثر کاربرد دو پری‌بیوتیک ایمنواستر و ایمنووال به مقدار ۱٪ و ۳٪ در جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان پرورشی (۲۴). گرچه رشد طولی بین

www.SID.ir

سطوح مختلف دو پری‌بیوتیک یکسان و فاقد تفاوت معنی‌دار بود ولی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) بیشترین و کمترین وزن نهایی نیز بترتیب در سطح ایمنووال ۱٪ و گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$)، در عین حال کل تیمارهای آزمایشی دارای افزایش وزن معنی‌داری نسبت به شاهد بودند. در تحقیق دیگری پری‌بیوتیک ایمونوژن در سطوح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲/۵ $gr.kg^{-1}$) در بچه‌ماهیان انگشت‌قد سفید آزمایش شد و عملکرد رشد و کارآیی‌تغذیه در سطح $1/5\ gr.kg^{-1}$ بهبود معنی‌داری یافت ($P<0.05$) (۸) تغذیه بچه‌ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) با افزودن سطوح (۰، ۲، ۴ و ۶ MOS ($gr.kg^{-1}$) به جیره منجر به افزایش معنی‌دار متوسّط وزن و طول بچه‌ماهیان در دو سطح $gr\ kg^{-1}$ ۴ و ۶ شد ($P < 0.05$) (۱۸). بعلاوه کاربرد MOS در مقادیر (۰، ۱/۵، ۳ یا ۴/۵ $gr.kg^{-1}$) در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۲۹). میزان رشد را بطور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد دلیل این اختلاف را می‌توان به نوع جنس و گونه ماهی، کیفیّت آب، شرایط محیطی و کارگاهی، نحوه تغذیه و رژیم غذایی ماهیان و حتّی درصد خلوص ماده پری‌بیوتیک نسبت داد. این در حالی است که در تحقیق اکرمی و همکاران (۲) تغذیه بچه‌ماهیان سفید با جیره حاوی پری‌بیوتیک MOS در مقادیر فوق‌الذکر سبب - اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین وزن و طول بین - تیمارهای مورد آزمایش نشد ($P > 0.05$)، همچنین بررسی اثر MOS در دوزهای (۰، ۲ و ۶ $gr.kg^{-1}$)، در هیبرید تیلاپیا (۱۰) و به میزان (۰ و ۳ $gr.kg^{-1}$) در تاس‌ماهی - خلیج مکزیک (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) (۱۵) نیز از نظر پارامترهای وزنی و طولی تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد ($P > 0.05$) که با نتیجه مطالعه حاضر همسو می‌باشد.

تأثیر پری‌بیوتیک‌ها بر شاخص‌های هماتولوژی و ایمنی متفاوت بوده است ولی آنچه مشخص است در مطالعهٔ حاضر طبق داده‌های جدول (۲) تقریباً همه گلبولهای سفید متمایز شده خون (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) تحت تأثیر دو سطح پری‌بیوتیک ایمنواستر تغییرکرد، به‌نحوی که با افزایش سطح ایمنواستر، درصد لنفوسیت‌های خونی افزایش و بترتیب درصد هریک از مقادیر مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل کاهش معنی‌داری یافت ($P \leq 0.01$). بیشترین درصد مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل که هر سه از گروه لوکوسیت‌های دارای خاصیّت بیگانه‌خواری می‌باشند در گروه شاهد مشاهده شد و در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ۲ و ۴ درصد ایمنواستر افزایش درصد لنفوسیت‌ها بعنوان شاخص ایمنی اختصاصی سلولار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود بطوری که تیمار ۴ درصد ایمنواستر بالاترین میزان لنفوسیت را بخود اختصاص داد.

برخلاف یافته این مطالعه، در بررسی سطوح ۱ و ۳ درصد ایمنواستر در تغذیه فیل‌ماهیان جوان (۲۵) با افزایش سطح ایمنواستر در جیره درصد لنفوسیت‌ها کاهش و درصد ائوزینوفیل افزایش معنی‌داری یافت و بیشترین لنفوسیت در گروه شاهد و بیشترین ائوزینوفیل در تیمار ۳ درصد مشاهده شد ($P < 0.05$). در عین حال مشابه تحقیق حاضر درصد مونوسیت با افزایش سطح ایمنواستر با کاهش‌معنی-داری مواجه شد و تیمار ۳ درصد دارای کمترین مقدار مونوسیت بود ($P < 0.05$)، امّا میزان نوتروفیل بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). در حالی که با اضافه نمودن پری‌بیوتیک اینولین به میزان ۱، ۲ و ۳ درصد به جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان پرورشی (*Huso huso*) (۱) بیشترین میزان لنفوسیت در سطح ۱ درصد اینولین مشاهده و در سطوح ۲ و ۳ درصد اینولین، درصد لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.05$). میزان - مونوسیت نیز تنها در سطح ۱ درصد اینولین از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0.05$). درصد نوتروفیل با وجود کاهش در سطح ۱ درصد اینولین نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$)، و پایین‌ترین

www.SID.ir

درصد ائوزینوفیل در تیمار ۳ درصد اینولین با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین تغذیه فیل‌ماهیان جوان با جیره حاوی سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد پری‌بیوتیک اولیگوفروکتوز منجر به افزایش معنی‌دار میزان لنفوسیت‌ها در دو سطح ۱ و ۲ درصد نسبت به گروه شاهد و سطح ۳ درصد شد ($P \leq 0.01$)، و درصد مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد (۱۱). امّا همسو با یافته این مطالعه، افزودن اینولین به میزان ۰/۵ و ۲ درصد به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش معنی‌دار درصد لنفوسیت در ماهیان تیمارشده با هر دو سطح اینولین درمقایسه با گروه شاهد گردید ($P < 0.05$) (۴).

در برخی موارد بررسی ماهیان تغذیه شده با پری‌بیوتیک‌ها مبیّن عدم تحریک‌پذیری مکانیسم ایمنی می‌باشد به نحوی که تحت شرایط آزمایشگاهی با سنجش لوکوسیت‌های بخش قدامی کلیه ماهی سیم دریایی(*Sparus aurata*) با مکمّل اینولین در دامنه ۱۰۰۰-۰ میکروگرم در لیتر دریافتند که اینولین تأثیری بر ایمنی ذاتی ندارد و حتّی در شرایط میدانی نیز عملکرد منفی به‌جا گذاشت، به نحوی که افزودن اینولین به میزان (۰/۵ یا ۱ درصد) بازدارندگی معنی‌داری در پارامترهای سیستم ایمنی به دنبال داشت و بطور قابل توجّهی از فعّالیت فاگوسیتوزی و تنفّس سلّولی در لوکوسیت‌ها جلوگیری نمود در نهایت نتیجه‌گیری شد که اینـولین نمی‌تواند محرّک ایمنی مناسبی برای این گونه باشد (۷). مطالعه تأثیر MOS در دوزهای (۰، ۲، ۴ و ۶ $gr.kg^{-1}$) در بچه‌ماهیان انگشت‌قد کپور معمولی نیز بیانگر این بود که با افزایش سطح MOS در جیره درصد لنفوسیت‌ها کاهش یافت (۱۹). همچنین افزودن سطوح متفاوت MOS به جیره غذایی ماهی تیلاپیای جوان (*Oreochromis niloticus*) (۱۷) و گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) (۲۷) پارامترهای هماتولوژیکی بویژه لوکوسیت‌های خون را تحت تأثیر قرار نداد ($P > 0.05$).

با استناد به مطالعات انجام شده توسّط سایر محققین می توان گفت مواردی نظیر زمان تغذیه، سن، گونه، جنس، دما و فاکتورهای محیطی می‌تواند نقش مهمی را در جذب ترکیبات پری‌بیوتیک داشته و باعث افزایش یا کاهش شاخص‌های رشدی شود. همچنین همانطور که قبلاً اشاره شد با توجّه به مکانیسم عملکرد β-1,3-Glucan و MOS در ترکیب ایمنواستر و تأثیر عمده این دو ماده در تحریک شاخص‌های خونی بویژه افزایش تولید لوکوسیت‌ها بخصوص ازنوع لنفوسیت‌ها بعنوان یکی از فاکتورهای مهم ایمنی اختصاصی، عدم بهبود قابل توجّه رشد و افزایش درصد لنفوسیت‌ها در بچه‌ماهیان سفید تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد توجیه می‌شود. در مجموع نتایج کسب شده از این تحقیق نشان داد تغذیه بچه‌ماهیان سفید در فرآیند مکمّل‌سازی جیره پایه با پری‌بیوتیک ایمنواستر بعنوان محرّک ایمنی به‌رغم تحریک تفریقی لوکوسیت‌ها، تأثیر افزایشی در تعداد لنفوسیت‌ها و به‌طبع ارتقاء توان ایمنی اختصاصی در بچه‌ماهیان انگشت‌قد سفید، افزایش رشد وزنی و طولی را بطور معنی‌داری تحت تأثیر قرار نداد.

لذا با توجّه به اثرات مثبت پری‌بیوتیک ایمنواستر بر وضعیّت ایمنی بچه‌ماهیان سفید پیشنهاد می‌گردد در خصوص تأثیر این ماده و سایر ترکیبات مشابه در سطوح ایمنی بچه‌ماهیان سفید در شرایط پرورش در استخرهای خاکی و نیز سایر گونه‌های اقتصادی جهت رسیدن به مـاهیان مقاوم‌تر بمنظور حفظ ذخایر استفاده شود تا بتوان در مورد عملکرد پری‌بیوتیکی این مواد اطمینان حاصل کرد. همچنین بهتر است در مطالعات آینده سیستم ایمنی ماهیان تیمار شده از نظر اندازه‌گیری لیزوزیم سرم و تعیین IgM کل سرم خون نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکّر و قدردانی: بدین‌وسیله از کلیه پرسنل محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت که در فراهم نمودن امکانات این پژوهش نهایت مساعدت را

Archive of SID
www.SID.ir

مبذول داشتند قدردانی می‌شود. همچنین از آزمایشگاه دامپزشکی دکتر میراعلمی رشت جهت همکاری صمیمانه شان در انجام عملیات خون‌شناسی تقدیر و تشکّر می‌گردد.

منابع

۱. اکرمی، ر.، قلیچی، ا. و احمدی‌فر، ا. ، ۱۳۹۰. تأثیر پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل-ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۲، صفحات ۱۳۱-۱۳۶.

۲. اکرمی، ر.، کریم‌آبادی، ع.، محمدزاده، ح. و احمدی‌فر، ا. ، ۱۳۸۸. تأثیر پربیوتیک مانان‌الیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، ترکیب بدن و مقاومت به تنش شوری در بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۸، شماره ۳ و ۴، صفحات ۴۷-۵۷.

۳. رضوی صیّاد، ب. ، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر. انتشارات مؤسّسه تحقیقات شیلات ایران. صفحه۹۰.

۴. شیخ الاسلامی‌امیری، م.، یوسفیان، م.، یاوری، و.، صفری، ر. و قیاسی، م. ،۱۳۹۰. بررسی تأثیر پری‌بیوتیک اینولین بر فاکتورهای سیستم ایمنی و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) در برابر باکتری بیماری‌زای استرپتوکوک. مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۴، شماره ۲، صفحات ۳۰۳-۳۱۲.

۵. عامری مهابادی، م. ، ۱۳۷۸. روشهای آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. صفحه۱۲۶.

۶. غنی‌نژاد، د.، مقیم، م.، عبدالملکی، ش. و صیّادبورانی، م. ، ۱۳۷۹. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۷۹-۷۸. انتشارات مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، بندرانزلی، صفحه ۹۸.

7. Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J. & Esteban, M. A. 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. Fish Shellfish Immunol., 24, 663–668.

8. Ebrahimi, G. 2010. Effects of prebiotic supplementation on survival, growth performance and feed utilization of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii 1901). Research Journal of Animal Sciences 4(6): 125-129

9. Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr., 125, 1401–1412.

10. He, S., Xu, G., Wu, Y., Weng, H. & Xie, H. 2003. Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. Chinese Feed, 23, 14–15. (In Chinese).

11. Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D. L., Mojazi Amiri, B., Yelghi, S. & Darvish Bastami, K. 2011. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. Fish Physiol. Biochem., 37, 91–96.

12. Kihara M., Ohba, K. & Sakata, T., 1995. Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal tunica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream (*Pagrus major*) a marine carnivorous teleost, under artificial rearing. Comp. Biochemistry. Physiology. A: Physiology 112, 629-634.

13. Mahious, A.S. & Ollevier, F., 2005. Probiotic and prebiotic in aquaculture: Review. Lst Rrgional Workshop on Techniques for Enrichment of Life Food for used in Larviculture, AAARC, Urmia, Iran pp. 17-26.

14. Olsen, R. E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T. M. & Ringø, E. 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquacult. Res., 32, 931- 934.

15. Pryor, G. S., Royes, J. B., Chapman, F .A. & Miles, R. D. 2003. Mannanoligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in gulf of Mexico sturgeon. N. Am. J. Aquac., 65, 106–111.

16. Rehulka, J., Minowk, B., Adamec, V. & Rehulka, E. 2005. Investigation of physiological and pathological levels of total plasma protein in rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Res., 36, 22-32.

17. Sado, R.Y., Almeida Bicudo, A.J.D. & Cyrino, J.E.P. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on haematological parameters and showed

Archive of SID
www.SID.ir

decreased feed consumption. J. World Aquac. Soc., 39, 821–826.

18. Samrongpan, C., Areechon, N., Yoonpundh, R. & Sirsapoome, P. 2008. Effect of mannan-oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008. 345-353.

19. Shamlufar, M., Akrami, R. & Soleymani, N. 2010. Effect of mannan oligosaccharide (MOS) on some hematological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases. October 26-27th; 2010, Tehran, Iran, Veterinary Council I.R. IRAN, p. 126.

20. Sink,T. D. & Lochmann, R. T. 2008. Preliminary observations of mortality reduction in stressed, *Flavobacterium columnare* – challenge golden shiners after treatment with a dairy–yeast prebiotic. N. Am. J. Aquac., 70, 192–194.

21. Sink, T. D., Lochmann, R. T., Goodwin, A. E. & Marecaux, E. 2007. Mortality rates in golden shiners fed high-fat diets with or without a dairy–yeast prebiotic before challenge with *Flavobacterium columnare*. N. Am. J. Aquac., 69, 305–308.

22. Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. & Sweetman, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Int., 15, 153–161.

23. Staykov, Y., Denev, S. & Spring, P. 2005. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos®) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L). In: Lessons from the Past to Optimise the Future (B. Howell and R. Flos, eds). European Aquaculture Society, Special Publication No 35, June 2005, pp. 431-432.

24. Ta'ati, R., Soltani, M., Bahmani, M. & Zamini, A. A. 2011. Effects of the prebiotics Immunoster and Immunowall on growth performance of juvenile beluga (*Huso huso*). J. Appl. Ichthyol., 27, 796-798.

25. Ta'ati, R., Soltani, M., Bahmani, M. & Zamini, A. A. 2011. Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10(2): 324-335.

26. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Freal, F., Sweetman, J., Tort, L. & Izquierdo, M. S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immunol., 23, 969–981.

27. Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R. & Klesius, P. H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus,* fed dcontaining commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. J. World Aquac. Soc., 38(1): 24–35.

28. Xu, B., Wang, Y., Li, J. & Lin, Q. 2009. Effects of prebiotic xylooligosaccharides on growth performance and digestive activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish Physiol. Biochem., 35, 351–357.

29. Yilmaz, E., Genc, M. A. & Genc, E. 2007. Effects of dietary mannanoligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Isr. J. Aquacult-Bamid., 59, 182–188.

Archive of SID

www.SID.ir

The study of Immunoster prebiotic effects on biometric factors with emphasis on weight and lenght and differential specification of leukocytes in Caspian sea *Rutilus kutum* fingerlings

Aftabgard M.[1], Zamini A.A.[1], Ershad Langroudi H.[1] and Miralami N.[2]

[1] **Fisheries Dept., Islamic Azad University , Lahijan Branch, Lahijan, I.R. of Iran**

[2] **Veterinary Diagnostic, Food Analyze & Qualitification Lab, Rasht, I.R. of Iran**

Abstract

Immunoster prebiotic was studied in 0, 2, 4 percent levels with the purpose of survey of weigh and lenght features and variability of blood leukocytes of Kutum fingerling with initial weight of 0.35±0.02gr in a period of 8 weeks. The experiment was performed with use of random design in one control group and two experimental treatments with 3 replicates and with 150 fingerlings in each tank. Feeding was varied from 15% to 20% of fish biomass. At the end of experiment, although weight and length average had no significant difference between control and experimental treatments ($P > 0.05$), but positive and significant difference was observed in differential specification of leukocytes ($P \leq 0.01$). Therefore, by increasing Immunoster levels in diet, the lymphocyte percent increased and respectively the monocyte, neutrophil and eosinophil percent decreased significantly. As, the Immunoster 4% level had highest lymphocyte and least monocyte, neutrophil and eosinophil ($P \leq 0.01$). The obtained results were showed that the study levels of Immunoster prebiotic didn't have considerable effects on growth performance in Kutum fingerlings, while it was able to play a positive and significant influence as an immunostimulant on blood leukocytes and increasing lymphocyte as an important cellular specific immune index.

Keywords: Immunoster prebiotic, Biometric, Leukocytes**,** *Rutilus kutum*

Archive of SID

www.SID.ir