

تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی *Abramis brama orientalis* سیم

سارا اسدی خمایی*^۱، نرگس مورکی^۱، علیرضا ولی پور^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه شیلات

۲- پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی، گیلان

پذیرش: ۹۵/۰۲/۰۷

دریافت: ۹۳/۰۴/۰۲

* نویسنده مسئول مقاله: Sara_asadi66@yahoo.com

چکیده:

اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (CNCM- MA 18/5 M, Lallemand, France) در مقادیر $T_1=1 \times 10^9$ ، $T_2=2 \times 10^9$ و $T_3=3 \times 10^9$ cfu در هر کیلوگرم جیره بر تغییرات برخی شاخص‌های خونی بچه ماهی سیم (*Abramis brama orientalis* Berg 1949) در مقایسه با غذای شاهد C (فاقد پروبیوتیک) در مدت ۶۰ روز بررسی شد. تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با وزن اولیه 22 ± 0.69 گرم در ۱۲ عدد وان فایبرگلاس ۱۱۰ لیتری به طور تصادفی توزیع شدند. غذادهی روزانه بین ۳-۵ درصد وزن توده زنده انجام شد و هر ۱۵ روز عملیات زیست‌سنجی صورت می‌گرفت. در انتهای دوره، میزان افزایش وزن و طول بچه ماهیان محاسبه شد و پس از خون‌گیری، پارامترهای خونی اندازه‌گیری شد. تعداد کل گلبول‌های قرمز (RBC)، میزان هماتوکریت (Ht)، هموگلوبین (Hb) و تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در تیمار تغذیه شده با سطح 2×10^9 cfu، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). ماهی تغذیه شده با میزان 2×10^9 cfu از افزایش وزن و طول خوبی نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند ($P < 0.05$). همچنین افزودن این پروبیوتیک به جیره غذایی بچه ماهی سیم باعث بهبود شاخص‌های خونی و در نتیجه مقاوم‌سازی ماهی در مواجهه با تغییرات محیطی و همچنین بهبود عملکرد ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان شد که در این میان T_2 و T_3 اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان دادند ($P < 0.05$).

کلید واژگان: پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*، خون، ماهی سیم

مقدمه

ماهی سیم با نام علمی *Abramis brama orientalis* (Berg 1949) متعلق به خانواده کپور ماهیان می باشد که از لحاظ اکولوژیک، بیولوژیک و اقتصادی جایگاه ویژه ای دارد. عوامل مختلفی از گذشته تاکنون باعث کاهش نسل این ماهی در دریای خزر شده است که از آن جمله صید بی رویه، آلودگی زیست محیطی، تخریب زیستگاه اصلی (تالاب انزلی) و پایین آمدن سطح آب دریای خزر طی چند دهه گذشته می باشد (Rahmin Abadi et al., 2008). به طور کلی ذخایر این ماهی نیاز به حمایت داشته که با توجه به کاهش ذخایر و در نتیجه اهمیت تغذیه در راستای افزایش ذخایر ماهیان به منظور فراهم نمودن شرایط مساعد برای بازسازی ذخایر در مراکز تکثیر و معرفی این ماهی به سیستم پرورشی در آینده، تهیه جیره غذایی مناسب و متشکل از نیازهای غذایی ماهی سیم بسیار ضروری به نظر می رسد. امروزه از باکتری هایی تحت عنوان پروبیوتیک به عنوان مکمل های غذایی در جیره به منظور بهبود شاخص های رشد و افزایش کارایی سیستم ایمنی آبزیان استفاده می شود. پروبیوتیک ها باعث حفظ توازن فلور میکروبی در لوله گوارش و همچنین سبب تقویت و تحریک سیستم ایمنی می گردد و می تواند بر علیه پاتوژن ها عمل کند (Verschuere et al., 2000). هدف از کاربرد پروبیوتیک رقابت با گونه های زیان آور و محدود کردن آن ها، جلوگیری از هدرروی انرژی متابولیک، افزایش قابلیت هضم، افزایش جذب مواد مغذی، تحریک پاسخ ایمنی و کاهش وقوع بیماری، کنترل بیماری ها و افزایش بقاء، افزایش رشد و تولید، بهبود شرایط محیطی و کیفیت آب استخر و رسوبات و غیره می باشد

(Castex, 2011). از انواع گونه های پروبیوتیک که در آبی پروری استفاده می شود می توان به ویبریوها، لاکتوباسیلها و باسیلوس ها اشاره نمود (RingØ and Birkbeck, 1999) که تحقیقات وسیعی بر روی اثر کاربرد آنان در جیره شده است (Denev et al., 2009). باکتری *Pediococcus acidilactici* یکی از گونه های مهم باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک است که اثرات سود بخشی آن همچون افزایش رشد، درصد بقا و تقویت سیستم ایمنی در برخی آبزیان از جمله قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Merrifield et al., 2009) و تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* Ferguson et al., 2010) به اثبات رسیده است. طیفی از باکتریسین ها توسط سویه های *P. acidilactici* ترشح می شوند (Anastasiadou et al., 2008 and Bhunia et al., 1990). این باکتریوسین ها سبب مقاومت گونه های آبزیان در برابر طیفی از باکتری های بیماری زا می شوند (Ferguson et al., 2010). علاوه بر آن پروبیوتیک ها از طریق تولید آنزیم های گوارشی نظیر آمیلاز و پروتئاز و تولید مواد مغذی ضروری میزان هضم و جذب مواد غذایی را افزایش می دهد که این خود سبب بهبود شاخص های رشد می گردد (Firouzbaksh et al., 2011). یکی از شاخص های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و فیزیولوژی ماهیان و به طور کلی اثر بخشی جیره ساخته شده و مکمل های به کار رفته، سنجش شاخص های خونی می باشد، که البته تحت تأثیر عوامل محیطی و سن موجود نیز می باشد (Fanouraki et al., 2007)، بنابراین برای مقایسه تأثیر رژیم های متفاوت غذایی بر سلامت بدن و سیستم

شود. فاکتورهای فیزیکیوشیمیایی آب به طور مرتب در طول ۶۰ روز دوره پرورش اندازه گیری شد.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت از شروع پرورش، تغذیه بچه ماهیان سیم با جیره پایه بر اساس سه درصد وزن بدن شان (برای تشخیص حد سیری ماهیان)، به مدت ۲ هفته برای گذراندن دوره آداپتاسیون صورت گرفت. این جیره حاوی ۳۹/۷۲ درصد پروتئین، ۱۲/۴۶ درصد چربی، ۲/۶۱ درصد فیبر و در کل ۳۴۲۰/۲۷ کیلوکالری انرژی می باشد که به وسیله نسخه ۲/۸ نرم افزار WinFeed نوشته شد (جدول ۱). پس از دو هفته تغذیه با جیره پایه، تغذیه سه تیمار با مقادیر مختلف پروبیوتیک (*Pediococcus acidilactici* - CNCM- MA 18/5 M, Lallemand, France) با نام تجاری باکتوسل و یک گروه شاهد، آغاز شد، که شامل: تیمار اول T1: حاوی 1×10^9 cfu در هر kg غذا، تیمار دوم T2: حاوی 2×10^9 cfu در هر kg غذا، تیمار سوم T3: حاوی 3×10^9 cfu در هر kg غذا و گروه شاهد C که از غذای پایه فاقد پروبیوتیک تغذیه شدند. برای کاهش احتمال خطا در طول پروژه، سه تکرار برای هر تیمار و شاهد نیز در نظر گرفته شد.

پس از سازگاری اولیه و عادت دهی بچه ماهیان به جیره غذایی پایه، عملیات زیست سنجی هر ۱۵ روز یکبار صورت گرفت. ماهی ها به مدت ۲۴ ساعت بعد از بیومتری به دلیل داشتن استرس بالا تغذیه نمی شدند. در شصتمین روز پروژه، چهارمین (آخرین) عملیات زیست سنجی انجام شد و طول و وزن هر کدام مشابه با زیست سنجی اول به تفکیک یادداشت گردید.

می توان شاخص های خونی را مورد ارزیابی قرار داد.

مطالعات مختلفی در مورد تاثیر پروبیوتیک بر شاخص های خونی ماهیان صورت گرفته است، که از آن جمله بررسی اثر پروبیوتیک *Bacillus subtilis* بر شاخص های خونی قزل آلی رنگین کمان (Kamgar and Ghane, 2012) (*Ancorhynchus mykiss*)، بررسی اثر پروبیوتیک *Micrococcus* بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپیا (*O. niloticus*) (Osman et al., 2010) و اثر پروبیوتیک *B. subtilis* بر شاخص های خونی کپور هندی (*Labeo rohita*) (Nayak et al., 2007) می باشد، به همین دلیل این پروژه با هدف بررسی تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر تغییرات احتمالی برخی شاخصهای خونی در ماهی سیم *Abramis brama orientalis* در مدت ۶۰ روز دوره پرورش انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

تعداد ۱۸۰ عدد بچه ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) با میانگین وزن اولیه 0.22 ± 0.02 گرم، در فروردین ماه ۱۳۹۱ از ایستگاه تحقیقات شیلات سفید رود واقع در شهرستان آستانه از توابع استان گیلان با تور پره صیادی چشمه ریز صید شده و به محل انجام پروژه واقع در همان مرکز انتقال یافتند. سپس تعداد ۱۵ عدد بچه ماهی سیم به صورت تصادفی بعد از هم دما سازی در هر یک از ۱۲ عدد حوضچه فایبرگلاس ۱۱۰ لیتری توزیع شدند. پس از معرفی ماهیان به حوضچه ها، به مدت ۲۴ ساعت تغذیه نشدند تا به محیط جدید عادت کرده و استرس ناشی از جابجایی در آن ها کم

جدول ۱ ترکیب جیره غذایی ساخته شده برای بچه ماهیان سیم

میزان / مقدار (گرم)	نوع ماده اولیه
۳۸/۳۸	پودر ماهی
۲۶/۳۸	آرد سویا
۹/۳۸	آرد گندم
۹/۳۸	آرد ذرت
۲/۴۷	روغن ذرت
۰/۱۰	آنتی اکسیدان
۲/۰۰	هم بند (ژلاتین)
۲/۰۰	مخلوط ویتامین**
۱/۵۰	مخلوط مواد معدنی***
۰/۴۰	ضد قارچ
۱/۰۰	DL-متیونین
۱/۰۰	لیزین
۲/۰۰	سیر
۱/۰۰	کولین کلراید
۳/۰۰	سبوس گندم

** ویتامین A، ویتامین D، ویتامین E، ویتامین K (منادیون) ویتامین B12، نیاسین، پانتوتنیک اسید، ریوفلاوین و روغن
*** مس، ید، آهن، منگنز، سلنیوم، روی و روغن

هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC)، تعداد گلبول های سفید (WBC) و شمارش افتراقی گلبول سفید بود. شمارش گلبول قرمز به کمک محلول هایم (Hayim) solution و با ملانژور صورت گرفت (Lewis et al., 2006). همچنین مقدار هموگلوبین از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین (Cyanmethemoglobin) (Blaxhall and Daisley, 1973) و میزان هماتوکریست از روش میکروهماتوکریست (Rehulka, 2000) محاسبه شد.

در پایان دوره ۶۰ روزه، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۱۰-۸ عدد از ماهی های هر وان به طور تصادفی صید گردید، مراحل بیهوشی توسط غلظت ۱۰۰ ppm پودر گل میخک انجام شد که با روش قطع ساقه دمی یک سی سی خون از هر تکرار درون لوله ویال (Eppendorf) آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) ریخته شد.

فاکتورهای خونی مورد مطالعه در این تحقیق شامل تعداد گلبول های قرمز (RBC)، هماتوکریست (PCV)، هموگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی (MCV)،

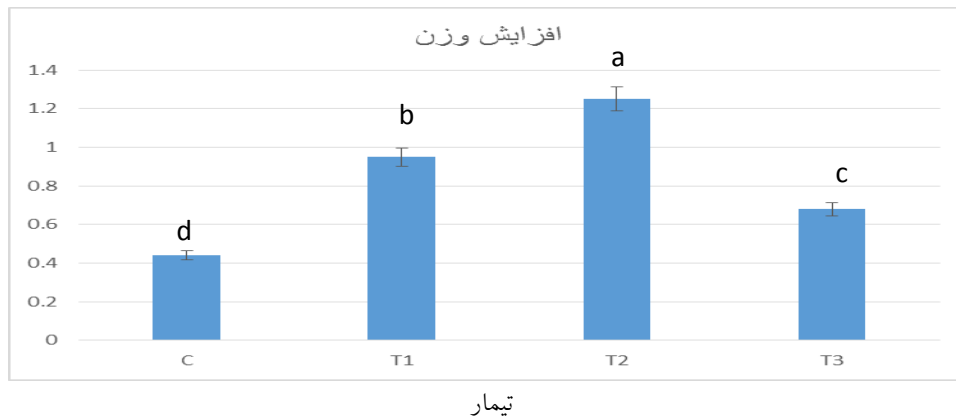
اختلاف بین داده ها از آزمون Post hoc Bonferroni برای تعیین معنی دار بودن یا نبودن اختلاف موجود بین تیمارهای مورد مطالعه در سطح ۹۵ درصد استفاده شد ($P < 0/05$).

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با وجود عدم تفاوت معنی دار در وزن اولیه ماهیان، در پایان ۶۰ روز و در آخرین مرحله زیست سنجی افزایش وزن و طول قابل توجهی در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با شاهد صورت گرفت که معنی دار بود ($P < 0/05$) (نمودار ۱ و ۲).

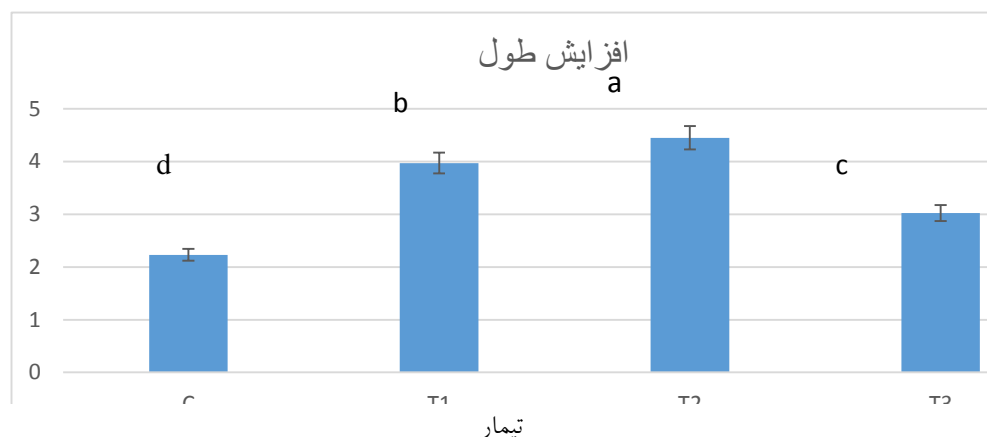
شمارش گلبول سفید به کمک ملانژور و لام نئوبار صورت گرفته است و در انتها پس از انجام مراحل رنگ آمیزی توسط گیمسا، تعداد هر یک از سلولها در شمارش افتراقی گلبولهای سفید به صورت جداگانه محاسبه شد (Lewis et al., 2006).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا نرمال بودن پراکنش داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov سنجیده شد. سپس داده ها به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) بررسی شدند. با مشاهده



نمودار ۱ مقایسه افزایش وزن ماهیان در تیمارهای مختلف طی ۶۰ روز دوره پرورش

حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده معنی دار بودن می باشد ($P < 0.05$)



نمودار ۲ مقایسه افزایش طول ماهیان در تیمارهای مختلف طی ۶۰ روز دوره پرورش

حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده معنی دار بودن می باشد ($P < 0.05$)

همچنین حداکثر افزایش طول در T_2 دیده شد، به طریقه میزان آن به $1/11 \pm 4/45$ میلی متر رسید در حالیکه در تیمار شاهد $0/56 \pm 2/23$ میلی متر بود در نتیجه، بیشترین طول نهایی و بیشترین افزایش طول در T_2 در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/05$) (نمودار ۲).

جدول ۲ نتایج سنجش شاخص های خون شناسی بچه ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilacti* جیره را نشان می دهد.

در شروع آزمایش تفاوت معنی داری بین تیمارهای مورد بررسی به لحاظ وزنی و طولی وجود نداشت و چهار گروه مورد بررسی، به لحاظ میانگین وزنی و طولی از وضعیت یکسانی برخوردار بودند ($P > 0/05$). حداکثر افزایش وزن در T_2 ، $1/25 \pm 0/01$ گرم بود؛ در حالیکه افزایش وزن در تیمار شاهد $0/43 \pm 0/04$ گرم به دست آمد. ماهیان سه تیمار تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک پس از ۶۰ روز در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی داری را از نقطه نظر افزایش وزن نشان دادند ($P < 0/05$) (نمودار ۱).

جدول ۲ مقایسه پارامترهای خون شناسی (میانگین \pm انحراف معیار) بچه ماهیان سیم در سه تیمار مورد بررسی طی ۶۰ روز پرورش

فاکتور	تیمار شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم
گلبول قرمز (تعداد در میلی متر مکعب $\times 10^6$)	$0/57 \pm 0/00^c$	$0/71 \pm 0/01^b$	$0/79 \pm 0/00^a$	$0/78 \pm 0/04^a$
غلظت هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	$5/23 \pm 0/12^c$	$6/57 \pm 0/12^b$	$7/30 \pm 0/17^a$	$7/23 \pm 0/38^a$
حجم هماتوکریت (درصد)	$25/67 \pm 0/58^c$	$31/67 \pm 0/58^b$	$35/67 \pm 0/58^a$	$35/00 \pm 1/37^a$
میانگین هموگلوبین گلبولی MCH (پیکوگرم)	$91/54 \pm 2/30$	$92/00 \pm 0/69$	$92/36 \pm 1/93$	$92/87 \pm 1/93$
غلظت متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز MCHC (گرم در دسی لیتر)	$20/39 \pm 0/01$	$20/64 \pm 0/76$	$20/47 \pm 0/42$	$20/66 \pm 0/15$
گلبول قرمز MCV متوسط حجم هر (فمتولیترا)	$451/83 \pm 4/68$	$447/05 \pm 5/57$	$450/67 \pm 5/86$	$449/11 \pm 6/43$
گلبول سفید (تعداد در میلی متر مکعب $\times 10^3$)	$6/30 \pm 0/10^d$	$7/33 \pm 0/21^c$	$7/93 \pm 0/15^b$	$9/27 \pm 0/15^a$

*نمودار حروف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار است ($P > 0/05$)

پروبیوتیک و ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0/05$) (جدول ۲).

با توجه به جدول ۲، ماهیان سه تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد دارای تعداد گلبول سفید بیشتری بودند. T_3 دارای بیشترین تعداد گلبول سفید نسبت به T_2 و T_1 بود و تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$).

درصد نوتروفیل و مونوسیت در سه تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک، افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). T_3 دارای بیشترین میزان نوتروفیل و مونوسیت در مقایسه T_2 و T_1 بود و با T_1 تفاوت معنی داری داشت ($P < 0/05$). از سوی دیگر میزان لنفوسیت در T_3 نسبت به سایر گروه ها کاهش یافت و اختلاف معناداری را با T_1 و گروه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). در مورد ائوزینوفیل نیز تفاوت معناداری بین تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0/05$) (جدول ۳).

با توجه به نتایج مذکور در جدول ۲ افزایش معنی داری در تعداد گلبول های قرمز خون ماهیان سه تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($P < 0/05$). T_2 و T_3 دارای بیشترین تعداد گلبول قرمز در مقایسه با سایر تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک بود ($P < 0/05$).

میزان هموگلوبین نیز به طور معنی داری در سه تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$).

در رابطه با میزان هماتوکریٹ با توجه به جدول ۲، افزایش معنی دار در گروه های تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($P < 0/05$). T_2 و T_3 دارای بیشترین میزان هماتوکریٹ در مقایسه با سایر تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک بود.

در خصوص میزان متوسط هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCH)، متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC) و مقدار حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) تفاوت معنی داری بین ماهیان سه تیمار تغذیه شده با

جدول ۳ مقایسه شمارش افتراقی گلبول های سفید (میانگین \pm انحراف معیار) بچه ماهیان سیم در سه تیمار مورد بررسی طی ۶۰ روز پرورش

فاکتور	تیمار شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم
نوتروفیل	۲۵/۶۷ \pm ۲/۰۸ ^d	۳۳/۳۳ \pm ۲/۰۸ ^{ac}	۳۶/۶۷ \pm ۱/۵۳ ^a	۴۱/۶۷ \pm ۱/۵۳ ^{ab}
لنفوسیت	۷۱/۳۳ \pm ۲/۰۸ ^d	۶۳/۰۰ \pm ۲/۶۴ ^{ac}	۵۹/۰۰ \pm ۲/۰۰ ^a	۵۳/۳۳ \pm ۱/۵۳ ^{ab}
مونوسیت	۱/۶۷ \pm ۰/۵۸ ^{ac}	۲/۳۳ \pm ۰/۵۸ ^a	۳/۰۰ \pm ۱/۰۰ ^a	۴/۰۰ \pm ۱/۰۰ ^{ab}
ائوزینوفیل	۱/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱/۰۰ \pm ۰/۰۰

*نیوود حروف نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار است ($P > 0/05$)

این ماهی را فراهم می آورد در بررسی حاضر افزودن پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به جیره غذایی بچه ماهیان سیم منجر به افزایش رشد آن ها در مقایسه با گروه

بحث مشخص نمودن ویژگیهای رشد ماهی سیم، باعث شناخت بیشتر آبرزی شده و زمینه حفاظت و مدیریت بیشتر ذخایر

اختیار قرار دادن پروبیوتیک توسط پرورش دهنده بوده باشد (Gomez-Gil et al., 2000).

یکی از شاخص های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و فیزیولوژی ماهیان، سنجش شاخص های خونی آنان می باشد، که تحت تأثیر تغذیه، عوامل محیطی و سن آن ها است (Fanouraki et al., 2007). بنابراین برای مقایسه تأثیر رژیم های متفاوت غذایی بر سلامت بدن و سیستم دفاعی، می توان شاخص های خونی را بررسی کرد (Rahulka et al., 2005). فاکتورهای خون شناسی، می توانند برای ارزیابی نیازهای غذایی در رژیم غذایی خاص و کیفیت غذا و یا استراتژی های غذایی مورد بررسی قرار گیرند؛ چرا که کمبود انواع ویتامین ها، مواد معدنی و همچنین سوء تغذیه (گرسنگی) و نیز سایر عوامل مرتبط با غذا اغلب باعث کم خونی در ماهی می گردند (Nakagawa, 2007). تأثیر تغذیه و مواد افزودنی غذایی بر شاخص های خونی در بعضی مطالعات مورد ارزیابی قرار گرفته است (مدنی و همکاران ۱۳۹۲ و زارع تبار و همکاران، ۱۳۹۳)

در این مطالعه تغییرات عمده خونی در ماهیان سیم در مقابل افزایش سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره را می توان به صورت افزایش معنی دار در تعداد گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد ذکر کرد. این نتیجه با نتایج Irianto و Austin (۲۰۰۲) در بررسی اثر *Carnobacterium* بر پارامترهای خونی ماهی قزل آلی رنگین کمان، Khattab و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی اثر پروبیوتیک *Micrococcus luteus* و *Pseudomonas* بر پارامترهای خونی ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* و حسینی مدنی و همکاران (1393) در بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر پارامترهای خونی ماهی گرین ترور

شاهد شد که این تفاوت معنی دار بود (نمودار 1) همچنین افزایش رشد در T₂ (ماهیان تغذیه شده با 2×10^9 cfu پروبیوتیک به ازای هر کیلوگرم جیره) نسبت به سایر تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک، مشهودتر بود. علت این افزایش ممکن است این باشد که پروبیوتیک با بهبود فلور طبیعی روده و در عین حال با ترشح آنزیم، باعث افزایش قابلیت هضم مواد غذایی و تجزیه ترکیبات غیر قابل هضم شده و در نتیجه سبب افزایش اشتها در آبزیان می شود (Irianto and Austin 2002 and Gatesoupe, 1999). تحقیقات متعدد دیگر نیز نشان داده است که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی آبزیان، رشد آن ها را افزایش می دهد از جمله این تحقیقات، بر روی ماهی قزل آلی رنگین کمان که با مکمل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس تغذیه شده بودند (Nikoskelainen et al., 2001) و تحقیق بر روی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* که با مکمل پروبیوتیکی *Pseudomonas sp* تغذیه شده بودند، می باشند (Osman et al., 2010). همچنین مشاهده شده است که گونه *P. acidilactici* سبب رشد لارو ماهی توربوت (Psetta maxima) شده است (Villamil et al., 2010)

با این وجود در مطالعات قبلی، نتایج متفاوتی با تحقیق حاضر در ارزیابی اثر پروبیوتیک بر عملکرد رشد و مصرف مواد غذایی توسط جانوران، گزارش شده است که اثر پروبیوتیک *P. acidilactici* بر قزل آلی رنگین کمان *O. mykiss* (Merrifield et al., 2010)، اثر پروبیوتیک تجاری (*Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* and *Saccharomyces*) بر ماهیان تیلاپیا *O. niloticus* (Shelby et al., 2006)، مثال هایی از این قبیل می باشند. علت اصلی تفاوت در نتایج مطالعات پیشین با مطالعه حاضر، می تواند به دلیل گونه میزبان، گونه پروبیوتیک و طریقه در

قرمز (MCHC) در ماهیان سیم تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد، مشاهده نشد.

به طور کلی سنجش شاخص خونی نقش مهمی در تعیین سلامت ماهیان ایفا می کند و به عنوان شاخص سلامت در گونه های مختلف شناخته شده است (Raweling et al., 2009). در مطالعه حاضر، تعداد گلبول های سفید در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته بود که سهم افزایش معنی دار تعداد گلبول سفید در T₃ نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود که این خود بیانگر تحریک سیستم ایمنی بدن ماهی توسط پروبیوتیک می باشد. گلبول های سفید نقش مهمی در ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی ایفا می کند و شمارش آن ها به عنوان شاخص سلامت شناخته شده است (زارع تبار و همکاران، ۱۳۹۳). افزایش تعداد گلبول های سفید می تواند به عنوان یک واکنش سیستم ایمنی غیر اختصاصی مطرح باشد که ناشی از مصرف پروبیوتیک هاست (مدنی و همکاران، ۱۳۹۳).. در نتیجه انتظار می رود که این ماهیان دارای مقاومت بیشتری در برابر بیماری و عوامل استرس زا باشند که این نیازمند بررسی بیشتر و کامل تری است (Nayak et al., 2007 and Firouzbaksh et al., 2011). افزایش تعداد گلبول های سفید در کپور هندی (*Labeo rohita*) که با مکمل پروبیوتیک *Bacillus subtilis* تغذیه شده بودند (Nayak et al., 2007) و در تیلاپیا *Oreochromis niloticus* که با مکمل پروبیوتیک *lactobacillus plantarum* تغذیه شده بود (Jatoba et al., 2008) نیز مشاهده شد..

در شمارش افتراقی گلبول های سفید مشاهده شد که تاثیر مکمل پروبیوتیک باعث افزایش تعداد نوتروفیل و مونوسیت، و کاهش لنفوسیت ها می شود که این تفاوت کاملاً معنادار بود (جدول ۳). در مطالعات پیشین، ماهی

Andinocara rivulatus شباهت دارد، که افزایش گلبول های قرمز، حجم هموگلوبین و حجم هماتوکریت را در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده کردند. هرچند که این نتایج با نتایج بدست آمده توسط Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) که کاهش معنی داری در حجم هماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* نسبت به گروه شاهد مشاهده کرده بودند و در مورد تعداد گلبول قرمز و حجم هموگلوبین، تفاوت معنی داری به دست نیامد، متفاوت بود. افزایش تعداد گلبول قرمز و در نتیجه کاهش اندازه آن، نشان دهنده کاهش مسیر انتشار اکسیژن به بافت هاست، به عبارت دیگر؛ با افزایش غلظت گلبول قرمز، قابلیت جذب بیشتر اکسیژن از آبش و انتشار اکسیژن در بافت ها بالاتر می رود (حسینی مدنی و همکاران، ۱۳۹۳). میزان کمتر هموگلوبین و به تبع آن کاهش ظرفیت حمل اکسیژن، ممکن است منجر به کاهش سطح اکسیژن خون در ماهیان گروه شاهد، شده باشد که به تبع آن، ماهیانی که تنها از جیره پایه بدون افزودن پروبیوتیک *P.acidilactici* تغذیه می شدند، ممکن است توانایی محدودتری در تأمین اکسیژن برای بافتها در شرایط غیر بهینه که نیاز به اکسیژن افزایش می یابد (از جمله دمای بالا، تراکم بستر و غیره)، داشته باشند. میزان فعالیت ماهی، تغییرات فصلی، دمای آب، درجه شوری، آلودگی آب، سن و تغذیه ماهی بر غلظت هموگلوبین خون مؤثرند (Houston and Cry, 1974) در شرایط عادی، ترکیب خون هر گونه، خاص همان گونه است که با هرگونه اعمال تغییرات، این ترکیب نیز دستخوش تغییر می شود (Banergee et al., 2002).

در تحقیق حاضر، هیچ تفاوت معناداری بر مقادیر حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین هر گویچه (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین هر گلبول

خونی، این آزمایش را بر روی دیگر گونه های پرورشی نیز انجام داد.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم میدانیم از همکاری صمیمانه مدیریت و کارشناسان ایستگاه تحقیقات شیلات سفیدرود و آزمایشگاه دکتر فدایی رشت به جهت در اختیار گذاشتن تجهیزات و امکانات به منظور انجام این تحقیق تشکر نماییم.

منابع

Aletor, V. A. and Egberongbe, O. 1998. Feeding differently processed soybean and haematological indices in the chicken diet. 5th Edition of *Journal of poultry Science*, 3: 34-36.

Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, (5): 771-781.

Bullis, R. A. 1993. Clinical pathology of temperate fresh water and estuarine fishes. In: Stoskopf MK (ed). *Fish Medicine*. Saunders Company, USA, 232-239.

Fanouraki, B. P., Divanach, M. and Pavlidis, M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pargrus pagrus*). *Aquaculture*, 265: 294-304.

Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcazar, J. L. and Davies, S. J. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied microbiology*, 1364-5072: 851-862.

Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture (review). *Aquaculture*, 180: 147-165.

Houston, A. H. and Cry, D. 1974. Thermoacclimatory variation in hemoglobin system of goldfish and rainbow trout. *Experimental biology*, 61: 445-461.

Irianto, A. and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture (Review). *Journal of Fish Diseases*, 25:633-642.

قزل آلاهی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* با میانگین وزنی $9/28 \pm 0/07$ گرم که به مدت ۶ هفته از جیره پایه به همراه پروبیوتیک *P.acidilactici* به میزان $10^7 - 10^8$ cfu در هر گرم غذا، تغذیه شده بود؛ تعداد کل گلبول های سفید به طور معنی داری در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بالاتر بود، در حالی که تفاوت معنی داری در تعداد لنفوسیت ها دیده نشد (Merrifield et al., 2009). Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی که روی تیلاپیای قرمز نر انجام دادند مشاهده کردند که با وجود اختلاف معنی دار در تعداد گلبول های سفید ماهیان تغذیه شده با رژیم پروبیوتیک *P.acidilactici* ($4/3 \times 10^6$ cell ml^{-1}) در مقایسه با گروه شاهد ($3/6 \times 10^6$ cell ml^{-1})، بین تعداد نوتروفیل ها تفاوت معناداری وجود نداشت

از آن جا که در این تحقیق، در شمارش افتراقی، تقریباً همه گلبول های سفید متمایز شده خون تحت سطوح مختلف پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* تغییر کرد، می توان چنین استنتاج کرد که سهم انواع گلبول های سفید در تحریک سیستم ایمنی ماهیان (افزایش گلبول های سفید)، یکسان نبوده است. همچنین به نظر می رسد با توجه به کاهش تعداد گلبول سفید در جمعیت ماهیان سیم گروه شاهد با وجود افزایش رشد، این ماهیان مقاومت کمتری در شرایط نامطلوب پرورشی با توجه به کاهش سطح ایمنی بدن خواهند داشت. مکانیسم دقیق تغییرات فاکتورهای خونی در مطالعه حاضر مشخص نیست ولی با توجه به مطالعات پیشین می توان این فرضیه را مطرح کرد که تغییر در پارامترهای خونی به دلیل پروبیوتیک موجود در جیره ماهیان سیم بوده است. در پایان پیشنهاد می شود تا برای اثبات تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر شاخص های

- Nayak, S. K., Swain, P. and 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 and Shellfish Immunology*, 23(4): 892-896.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. and Bylund, G. 2001.** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*, *Aquaculture*, 198: 229-236.
- Osman, H. A., B.Ibrahim, T., Soliman1, W. and Aboud, O. 2010.** Improvement growth and immune status using a potential probiotic bacteria *Micrococcus* species among Cultured *Oreochromis niloticus*. *Newyork science journal*, 3(10): 5-11.
- Rahim Abadi, B., Khara, H. and Sattari, M. 2008.** The Parasitic Infection of Oriental bream *Abramis brama orientalis* Berg 1949 in Aras Lake. *Journal of Biology Science*, Lahijan Uni, (3): 83-96.
- Rehulka, J. 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 190: 27-47.
- Ringø, E. and Birkbeck, T. H. 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30: 73-93.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000.** Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus*. CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3): 1139-1146.
- Jatoba, A., Vieira, F. N., Buglionneto, C. C., Silva, B. C., Mourino, J. L. P., Jeronimo, G. T., Dotta, G. and Martins, M. L. 2008.** Use of lactic acid bacteria isolated from the intestinal tract of tilápiado-Nile as probiotic. *Agricultural Research*, 43(9): 1201-1207.
- Kamgar, M. and Ghane, M. 2012.** Evaluation of *Bacillus subtilis* Effect as Probiotic on Hematological Parameters of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Following Experimental Infection with *Streptococcus iniae*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7: 422-430.
- Khattab, Y. A., Shalaby, A. M. and Abdel-Rhman, A. M. 2006.** Use of probiotic bacteria as growth promoters antibacterial and their effects on physiological parameters of *O. niloticus*. ISTA7 proceedings 7th International symposium on Tilapia in Aquaculture, Boca Del Rio, Veracruz, Mexico., 156-167.
- Lewis, S., Bain, B. and Bates, I. 2006.** Dacie and Lewis Practical Hematology. Tenth Edition. Philadelphia, PA. Churchill Livingstone, Elsevier; 722p.
- Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B. and Davies S. J. 2009.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture nutrition*, 10.1111/j. 1365-2090: 1-7.



The effects of dietary probiotic, *Pediococcus acidilactici*, on hematological parameters of oriental Bream, *Abramis brama orientalis*, fry

Sara Asadi Khomami^{1*}, Narges Mooraki¹, Alireza Valipour²

1-Faculty of Fisheries, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

2- Aquaculture Institute of Inland Waters, Bandar Anzali, Guilan, Iran

Received: 23.06.2014

Accepted: 26.04.2016

*Corresponding Author: sara_asadi66@yahoo.com

Abstract:

The objective of this study was to evaluate the effect of probiotic, *Pediococcus acidilactici* (CNCM-MA 18/5 M, Lallemand, France) in concentrations of T1: 1×10^9 , T2: 2×10^9 and T3: 3×10^9 cfu / kg of diet on changes some hematological parameters of bream fry (*Abramis brama orientalis*, Berg 1949) in comparison with diet control, C, (untreated) for 60 days. One hundred eighty Bream fry with randomly in initial weight of 2.69 ± 0.22 g divided in 12 fiberglass tanks (110 L) and offered feed at 3-5% body weight, daily. At the end of the trial blood parameters measured. The total number of red blood cells, hematocrit, hemoglobin and white blood cells levels showed a significant increase in treatment fed with 2×10^9 cfu probiotic per kilogram of diet ($P < 0.05$). In differential white blood cell (WBC) count, the number of neutrophils and monocytes, and lymphocytes increased significantly in treatments fed with probiotics. The highest increase in neutrophils and monocytes, and the highest decrease in lymphocytes observed in T₃ (3×10^9 cfu kg⁻¹). According to the results, it concluded that adding probiotic *Pediococcus acidilactici* to the fry bream (*Abramis brama orientalis*, Berg 1949) diet, increase blood parameters related to red blood cells (RBC), diseases resistance and improve non specific immune response in bream.

Keywords: Probiotic *Pediococcus acidilactici*, Blood, Oriental bream *Abramis brama orientalis*