نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 7، شماره 3، پاییز 1394، ص. 380-373

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 7, No. 3, Fall 2015, p. 373-380

مطالعه تأثیر پربیوتیک مانان_الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان بر برخی شاخص های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا اکرمی[1*] - فاطمه نوری چناشک[2] - امیرحسین ناصری[2] - مجید رازقی منصور[3]

تاریخ دریافت: 1393/06/04
تاریخ پذیرش: 1394/05/12

چکیده

اثر مقطعی استفاده از پربیوتیک مانان_الیگوساکارید و بتا-1و3-گلوکان بر برخی مشخصه‌های خونی و بیوشیمی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از 6 هفته مورد بررسی قرار گرفت. بچه ماهیان به میزان 1/5 گرم پربیوتیک در هر کیلوگرم جیره با چهار استراتژی تغذیه ای شامل تیمار شاهد (A): تغذیه با جیره تجاری و پایه بدون پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار B: تغذیه مداوم با پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار C: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تغذیه با جیره شاهد بدون پربیوتیک به مدت یک هفته و سپس تکرار این عمل تا هفته ششم و تیمار D: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک به مدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این فرآیند تا هفته ششم پرورش داده شدند. نتایج نشان داد تغذیه ماهیان با استراتژی مداوم پربیوتیکی سبب شد تعداد کل گلبولهای سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، مونوسیت، هتروفیل و لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد و سایر استراتژی‌های تغذیه‌ای افزایش یابد اگرچه تفاوت معنی‌داری بدست نیامد ولی افزایش معنی داری در تعداد کل گلبولهای قرمز حاصل شد. میزان گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول در ماهیان تغذیه شده با استراتژی مداوم نسبت به سایر تیمار ها پایین تر ولی درصد پروتئین تام و آلبومین بالاتر بود ولی تفاوت معنی‌دار نبود. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که افزودن 1/5 گرم پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتا 1-3 گلوکان در هر کیلوگرم جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلای پرورشی با استراتژی مداوم می تواند منجر به بهبود مشخصه‌های خونی شود.

واژه‌های کلیدی: پربیوتیک، شاخص‌های خونی، قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*).

مقدمه

ماهی قزل آلا با دارا بودن ویژگی های منحصر به فرد از جمله کیفیت گوشت، اهلی شدن سریع و آسان، سخت گیر نبودن در غذاگیری، امکان پرورش متراکم، طول نسبتاً کوتاه دوره پرورش و مقاومت ماهی به طیف وسیعی از شرایط فیزیکوشیمیایی محیط از گونه های مهم و تجاری در جهت تأمین پروتئین مورد نیاز جوامع بشری مطرح می باشد (12). با توجه به سیستم پرورش متراکم ماهی قزل آلای رنگین کمان، تقویت سیستم ایمنی این ماهی در برابر شرایط استرس زا و بیماری ها امری ضروری است.

استفاده از آنتی بیوتیک ها و داروهای شیمیایی در آبزی پروری در چند سال گذشته تبعاتی از جمله خطر مقاوم شدن پاتوژن به این داروها، باقی ماندن داروها در گوشت ماهیان مورد تغذیه انسان و نیز آلودگی های زیست محیطی را به دنبال داشته است (26). لذا شرایط ایجاب می کند که برای ارتقاء میزان مقاومت و همچنین افزایش رشد و بازماندگی این گونه از ترکیبات مناسبی در جیره غذایی استفاده شود تا در نهایت تولیدات آنها افزایش یابد. از جمله این ترکیبات می توان به پربیوتیک ها (Prebiotic) اشاره نمود.

پربیوتیک ها عناصر غذایی غیر قابل هضمی هستند که از طریق

1- دانشیار گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر،
2- دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر،
3- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، آزادشهر.
(* نویسنده مسئول: (akrami.aqua@gmail.com

تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از گونه های باکتریایی که در روده وجود دارند، اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می بخشد (11). عناصر غذایی که به عنوان پربیوتیک طبقه بندی می شوند باید خواصی از جمله عدم هضم و جذب در بخشهای فوقانی دستگاه گوارش، تخمیر گزینشی توسط یک یا تعدادی از باکتری های مفید روده و تحریک فلور میکروبی روده به تولید ترکیبات سالم را داشته باشند (9). تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و اسیدلاکتیک ناشی از تخمیر پربیوتیک منجر به کاهش pH روده می شود که شرایط مناسبی را برای رشد باکتری های اسید لاکتیک فراهم می کند (22). مانان الیگوساکارید یک کربوهیدرات پیچیده می باشد که از دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* مشتق شده است. این ترکیبات شامل مانوز به عنوان عنصر اولیه کربوهیدرات بوده و مانع از اتصال و کلونیزه شدن باکتری های بیماریزا به دستگاه گوارش گردیده و اثرات معکوس متابولیت های میکروفلور را کاهش می دهد (21). همچنین این ترکیب پربیوتیکی حاوی مقادیر ویژه و موثری از بتا- 1و3 – گلوکان‌ها می باشد که ترکیب اصلی غشاء سلول مخمر *S. cerevisiae* است. این ترکیبات، مولکولهای پلی ساکاریدی بزرگی هستند که شامل کربوهیدرات گلوکز با زنجیره جانبی 1و3 می باشند که بوسیله آنزیمهای گلوکاناز تجزیه نمی شوند. بتا گلوکان‌ها می توانند از غشاء مخاطی سلولهای بافت روده عبور نموده و با تحریک ماکروفاژها بعنوان اولین خط دفاعی داخلی بدن به افزایش قدرت سیستم ایمنی کمک می نماید.

فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان در گونه های مختلف با هم تفاوت داشته و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه ای، سن و... دارد (19). خون به عنوان یک بافت سیال، یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می گردد. بنابراین آگاهی از تصویر و تابلوی خونی و پارامترهای بیوشیمیایی این ماهیان ضروری است تا با داشتن اطلاعات خون شناسی در حالت طبیعی و مقایسه آن با اطلاعاتی که در حالات و شرایط بیماری بدست می آید به تشخیص بیماری، درمان و در نهایت پیشگیری و کنترل آن جهت هدایت مدیریت بهداشت و افزایش تولید پرداخت (1).

با توجه به تحقیقات صورت گرفته، مطالعات اندکی در مورد اثر پربیوتیک ها بویژه پربیوتیک مانان الیگوساکارید بر روی فاکتورهای خونی ماهیان صورت گرفته است که از جمله این تحقیقات می توان به تحقیقات هیسانو و همکاران (2007) بر روی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*)، ولکر و همکاران (2007) بر روی گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*)، سادو و همکاران (2008) بر روی تیلاپیای نیل جوان (*Oreochromis niloticus*)، اندرز و همکاران (2009) بر روی گونه راهو (*Labeo rohita*)، یی و همکاران (2011) بر روی کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، رازقی منصور و همکاران (2012)، فدایی (1392) بر روی فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی و شعاعی و همکاران (1391) بر روی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اشاره کرد (2، 7، 13، 18، 20، 23، 28، 30). با توجه به تحقیقات متعددی که در مورد کاربرد پربیوتیک مانان الیگوساکارید در ماهیان انجام شده ولی تاکنون مطالعه جامعی در خصوص اثر مقطعی آنها بر عملکرد رشد و ایمنی صورت نگرفته است و فقط میتوان به یک تحقیق انجام شده در میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) اشاره کرد (3). با توجه به توضیحات فوق و به دلیل اینکه هنوز تا به حال گزارشی مبنی بر استفادهٔ مقطعی محرک های ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان منتشر نشده است و همچنین با توجه به اهمیت تقویت سیستم ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، که صنعت پرورش آن در حال حاضر در داخل کشور به خوبی توسعه یافته است در این مطالعه اثر استفاده از پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان به صورت پیوسته و مقطعی بر برخی پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با 3 تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد با 3 تکرار به مدت 6 هفته در کارگاه آموزشی و پژوهشی آبزی پروری دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر انجام پذیرفت. ماهیان با میانگین وزن 0/19± 26/45 گرم و به تعداد 240 قطعه تهیه شدند. ماهیان برای سازگاری بیشتر به مدت 2 هفته قبل از شروع آزمایش نگهداری و در این مدت تغذیه با غذای تجاری فاقد محرک ایمنی انجام شد. پس ازگذشت دوره سازگاری و پس از طی عملیات رقم بندی، ماهیان بطور تصادفی به 12 حوضچه فایبرگلاس 500 لیتری منتقل شدند. پربیوتیک مورد استفاده مانان_الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان با نام تجاری تکنوموس (TechnoMos®) بود که به میزان 1/5 گرم در هر کیلوگرم (23) به جیره تجاری ماهی قزل آلا (39٪ پروتئین، 18٪ چربی و 19/02 مگاژول در کیلوگرم انرژی ناخالص؛ محصول شرکت خوراک دام و آبزیان شمال) افزوده شد. ماهیان با چهار استراتژی تغذیه ای شامل تیمار شاهد (A): تغذیه با جیره تجاری و پایه بدون مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار (B): تغذیه مداوم با مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار (C): تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تغذیه با جیره شاهد بدون پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تکرار این عمل تا هفته ششم و تیمار (D): تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این

فرآیند تا هفته ششم (3) تغذیه شدند. غذادهی به ماهیان به میزان 4 درصد وزن بدن 3 بار در روز (ساعات 8، 12 و 16) بود. از روغن مایع به میزان 30 سی سی به ازای هر کیلوگرم غذا جهت اتصال پربیوتیک به به جیره استفاده گردید. لازم به ذکر است که در مورد جیره شاهد نیز عملیات فوق بدون اضافه کردن پربیوتیک انجام شد (17). طی دوره آزمایش میانگین دمای آب 1/4± 16/3، میانگین اکسیژن محلول 0/47± 8/7 میلی گرم در لیتر و میانگین pH 0/07± 7/2 بود. نمونه گیری از ماهیان قزل آلای پرورش یافته با استراتژیهای مختلف تغذیه ای با پربیوتیک در انتهای دوره پرورش با متوسط وزنی 70 گرم صورت گرفت. 24 ساعت قبل از خونگیری تغذیه ماهیان قطع شد و سپس 36 عدد ماهی (3 ماهی به ازای هر تکرار) به ظاهر سالم به طور تصادفی انتخاب شدند و پس از بیهوشی در محلول گل میخک با دوز 150 قسمت در میلیون (10) از ورید ساقه دمی آنها خونگیری بعمل آمد. از نمونه های خون جمع آوری شده مقدار 2 سی سی برای جداسازی سرم در لوله های سرولوژی فاقد ماده ضد انعقاد و 2 سی سی در ظروف حاوی ماده ضدانعقاد هپارین تقسیم گردید. سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور 3000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سرم جدا و با سمپلر در لوله های کوچک تخلیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال و در شرایط فریزر (دمای 20- درجه سانتیگراد) تا انجام آزمایش نگهداری شد.

روشهای اندازه گیری

فاکتورهای خونی مورد مطالعه به روش توصیه شده توسط فلدمن و همکاران (2000) شامل تعداد گلبولهای قرمز (RBC)، تعداد گلبولهای سفید (WBC)، هماتوکریت (PCV) و هموگلوبین (Hb) بود (8). همچنین شمارش افتراقی گلبولهای سفید شامل هتروفیل (نوتروفیل)، لنفوسیت و مونوسیت نیز انجام شد (8). برای اندازه گیری پارامترهای بیوشیمی، سرم خون جداسازی و با استفاده از دستگاه Semianalyser مدل SEAC طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از کیت های آزمایشگاهی انجام شد. پروتئین تام به روش بیوره (Biuret)، کلسترول به روش کلسترول اکسیداز (Choestrol oxidase)، تری گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز (-Lipase/GPO PAP)، آلبومین به روش بروموکرزول (Bromocresol Green) و گلوکز به روش گلوکز اکسیداز (Glucose oxidase) اندازه گیری شد (4).

تجزیه تحلیل آماری

در ابتدا آزمون نرمالیتی (normality) به وسیله ی آزمون Shapiro-Wilk انجام شد. تجزیه و تحلیل بر روی داده های مربوط به تغییرات شاخص های خونی و بیوشیمی سرم از طریق آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح 5% با استفاده از نرم افزار SPSS (Ver. 18) انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تأثیر استراتژیهای مختلف تغذیه ای با پربیوتیک مانان_الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان تفاوت معنی داری را در تعداد گلبولهای قرمز خون در بین تیماهای مختلف در انتهای آزمایش نشان داد (P<0/05). بیشترین و کمترین تعداد گلبولهای قرمز خون به ترتیب در تیمار مداوم پربیوتیک و گروه شاهد بود. در خصوص تعداد کل گلبولهای سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، مونوسیت، لنفوسیت و هتروفیل تفاوت معنی داری در استراتژیهای مختلف تغذیه پربیوتیکی و تیمار شاهد مشاهده نشد (P>0/05). اگرچه بیشترین تعداد گلبولهای سفید، هموگلوبین، مونوسیت، لنفوسیت و هتروفیل مربوط به ماهیان تغذیه شده با پربیوتیک مداوم وکمترین مقدار آن مربوط به تیمار شاهد بود (جدول 1).

همچنین نتایج حاصل از تأثیر استراتژیهای مختلف تغذیه پربیوتیکی بر پارامترهای بیوشیمی سرم خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان تفاوت معنی داری در پروتیین تام، آلبومین، تری گلیسرید و کلسترول نشان نداد (P>0/05). با اینحال کمترین مقدار تری گلیسرید و کلسترول و بیشترین میزان پروتئین و آلبومین در ماهیان تغذیه شده با استراتژی پربیوتیک مداوم بدست آمد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه تفاوت معنی داری در میزان گلوکز سرم نشان داد و کمترین سطح گلوکز در ماهیان تغذیه شده با پربیوتیک مداوم بود (P<0/05) (جدول 2).

به نظر می‌رسد پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان مورد استفاده در سطح 1/5 گرم در هر کیلوگرم جیره با استراتژی مداوم، از طریق اتصال به گیرنده های شبه لکتین روی لکوسیت ها و افزایش تکثیر ماکروفاژها سبب تحریک سیستم ایمنی در ماهی قزل آلا گردیده است (5). دلیل افزایش جمعیت لکوسیت ها در کل استراتژیهای تغذیه ای با پربیوتیک و علی الخصوص در استراتژی مداوم را می‌توان به تخمیر این فرآورده پربیوتیکی توسط سلولهای انتروسیت روده و در نتیجه تأثیر مناسب آن بر سیستم ایمنی ربط داد (16). بنابراین می‌توان اظهار کرد که مواد محرک سیستم ایمنی، لزوماً نمی توانند اثر معنی داری بر شاخص های هماتولوژیک داشته باشند

جدول 1- تأثیر استراتژیهای مختلف پربیوتیکی بر پارامترهای هماتولوژی (میانگین ± انحراف معیار) ماهیان قزل آلای تغذیه شده پس از 6 هفته پرورش[1]

Table 1- Effect of discontinuous administration of prebiotic on hematological parameters (mean ± SD) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 6 weeks treatments[1]

پارامترهای هماتولوژی Hematological Parameters	جیره‌های آزمایشی[2] Experimental Diets[2]			
	A	B	C	D
گلبول قرمز RBC (mm 10^6)[3]	0.71 ± 0.06 [b]	0.80 ± 0.04 [a]	0.72 ± 0.08 [b]	0.75 ± 0.05 [ab]
گلبول سفید WBC(mm 10^3)[4]	6350 ± 663.7	6975 ± 716.6	6711.1 ± 966.2	6911.1 ± 844.7
هموگلوبین Hemoglobin (g/dl)	7.24 ± 0.75	7.92 ± 0.93	7.43 ± 0.50	7.28 ± 0.54
هماتوکریت Hematocrit (%)	38.2 ± 4.2	42.3 ± 5.5	42.2 ± 1.4	40.5 ± 2.7
مونوسیت Monocyte (%)	2.9 ± 1.1	3 ± 1	2.8 ± 1.1	2.5 ± 1
لنفوسیت Lymphocyte (%)	78.1 ± 0.69	78.4 ± 1.51	77 ± 2.17	77.2 ± 2.16
نوتروفیل Neutrophil (%)	15.7 ± 2	17.2 ± 1.3	17 ± 1.7	16.3 ± 2

[1]میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<0.05$).

[2]تیمار A (شاهد): تغذیه با جیره تجاری و پایه بدون مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار B: تغذیه مداوم با مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار C: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تغذیه با جیره شاهد بدون پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تکرار این عمل تا هفته ششم، تیمار D: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این فرآیند تا هفته ششم.

[1] Means within same row with different superscripts differ ($P<0.05$).

[2] A: The control diet without probiotic supplementation fed for 6 weeks, B: The control diet plus probiotic fed for 6 weeks, C: Diet, B fed for one week then diet A fed for one week and continuing this regime up to 6 weeks, D: Diet B fed for 2 days then diet A fed for 5 days and continuing this regime up to 6 weeks.

[3] Red blood cell

[4] White blood cell

ولی ممکن است پارامترهای ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند (26). تغییرات سطح لنفوسیت ها بین تیمارهای مورد بررسی نیز روندی مشابه لکوسیت ها نشان داد به طوری که میزان لنفوسیت ها در استراتژی تغذیه مداوم پربیوتیک نسبت به تیمار شاهد و سایر گروههای آزمایشی افزایش یافت که نشان دهنده تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه شده با این استراتژی تغذیه ای می‌باشد. همچنین افزایش تعداد لنفوسیت نشان دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماریزای مهاجم می‌باشد. در تحقیق حاضر افزایش لنفوسیت در استراتژی تغذیه مداوم پربیوتیکی نشانگر تأثیر این ماده بر کاهش اثر استرس های مزمن و ارتقاء مقاومت بدنی و سازگاری های فیزیولوژیک با محیط پرورشی می‌باشد. هر چند افزایش در درصد مونوسیت بیانگر افزایش ایمنی است ولی در برخی گزارشها بیان شده است که کاهش تعداد مونوسیت ها نشان دهنده عدم ابتلای بدن به پارازیت ها و عوامل مهاجم خارجی می باشد (26).

در تحقیق حاضر بیشترین درصد گلبولهای سفید خون را لنفوسیت ها و نوتروفیل ها تشکیل می‌دادند و این مسئله در سایر ماهیان نیز به اثبات رسیده است (14). میزان گلبول های قرمز در تیمارهای مختلف آزمایش نیز تغییر معنی داری نشان داد و در تیمارهای پربیوتیکی علی الخصوص در استراتژی مداوم بیشترین تعداد گلبول قرمز بدست آمد.

تعداد گلبول های قرمز خون و هموگلوبین خون ماهی با تغییرات فصلی، سیکل جنسی یا سایر موارد فیزیولوژیک دچار تغییرات معنی داری می‌شود (15). با توجه به ثابت بودن شرایط محیطی و ماهی مورد آزمایش، می‌توان از تأثیر این عوامل بر تغییرات این شاخص در تیمارهای مختلف چشم پوشی کرد. علاوه بر این میزان هموگلوبین و هماتوکریت نیز تابعی از تغییرات گلبول های قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. گلوکز خون متغیرترین پارامتری است که به میزان بسیار زیادی تحت تأثیر استرس دستکاری و حمل، استرس محیطی، تغییرات فصلی، وضعیت تغذیه ای و بلوغ جنسی قرار دارد (13).

در مطالعه حاضر مقادیر گلوکز خون ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف مخلوط پربیوتیکی بین 63-45 میلی گرم در دسی لیتر بود.

جدول 2- تأثیر استراتژیهای مختلف پربیوتیکی بر پارامترهای بیوشیمیایی (میانگین ± انحراف معیار) ماهیان قزل آلای تغذیه شده پس از 6 هفته پرورش

Table 2- Effect of discontinuous administration of prebiotic on biochemical parameters (mean ± SD) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 6 weeks treatments

متابولیتهای پلاسما Plasma metabolites	جیره‌های آزمایشی[2] Experimental Diets[2]			
	A	B	C	D
گلوکز Glucose (mg dL^{-1})	59 ± 14	48 ± 6.1	45.7 ± 6.05	63.8 ± 10.6
پروتئین تام Total protein (mg dL^{-1})	4.16 ± 0.35	4.29 ± 0.43	4.27 ± 0.25	4.15 ± 0.30
آلبومین Albumin (g dL^{-1})	1.98 ± 0.23	2.15 ± 0.27	2.05 ± 0.18	2.08 ± 0.17
تری گلیسرید Triglycerides (mg dL^{-1})	417.4 ± 71.5	392.77 ± 83.85	469.2 ± 123.3	397.6 ± 93.1
کلسترول Cholesterol (mg dL^{-1})	378.4 ± 66.5	364.3 ± 68.9	391.1 ± 58.5	362 ± 57.3

[1]میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<0.05$).

[2]تیمار A (شاهد): تغذیه با جیره تجاری و پایه بدون مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار B: تغذیه مداوم با مکمل پربیوتیک بمدت 6 هفته، تیمار C: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تغذیه با جیره شاهد بدون پربیوتیک بمدت یک هفته و سپس تکرار این عمل تا هفته ششم، تیمار D: تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این فرآیند تا هفته ششم.

[1]Means within same row with different superscripts differ ($P<0.05$).

[2]A: The control diet without probiotic supplementation fed for 6 weeks, B: The control diet plus probiotic fed for 6 weeks, C: Diet, B fed for one week then diet A fed for one week and continuing this regime up to 6 weeks, D: Diet B fed for 2 days then diet A fed for 5 days and continuing this regime up to 6 weeks.

بیشترین مقدار این پارامتر (معادل 63 گرم در دسی لیتر) همراه با تفاوت معنی داری در استراتژی تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این فرآیند تا هفته ششم مشاهده شد که نشانگر توانایی ماهی قزل آلا در متابولیسم ترکیبات کربوهیدراته در جیره می‌باشد و مکانیسم آن به این صورت است که ماهی با انجام واکنش های بیوشیمیایی گلیکونئوژنز، گلیکوژن بافت را به گلوکز تبدیل کرده و وارد جریان خون می‌کند.

پروتئین تام پلاسما یک پارامتر وابسته برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک ماهی است و یک ابزار کمکی تشخیصی محسوب می‌شود. از سوئی میزان پروتئین تام و آلبومین می‌تواند وضعیت تغذیه ای و سلامتی ماهیان را به تصویر کشاند (24). افزایش در میزان پروتئین و آلبومین افزایش نسبتاً زیادی در ایمنی ذاتی را منعکس می نماید، به عبارت دیگر افزایش در غلظت پروتئین تام و آلبومین می تواند به علت واکنش های غیر اختصاصی قویتر در ماهی باشد (27). در تحقیق جاری نیز افزایش پروتئین تام در تیمارهای حاوی پربیوتیکی با استراتژی هفتگی می‌تواند حاکی از عملکرد مناسب کبد و کلیه باشد. شعاعی و همکاران در سال 1391 افزایش معنی داری را در میزان هماتوکریت، هموگلوبین، آلبومین، پروتئین تام و کلسترول ماهی قزل آلای تغذیه شده با پربیوتیک مانان_الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان گزارش کردند (23).

هیسانو و همکاران در سال 2007 گزارش نمودند که مصرف حداقل 2 درصد مخمر دهیدراته (منبع اصلی مانان الیگوساکارید) در جیره غذایی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) تأثیر معنی داری بر پارامترهای هماتولوژی نداشت که تا حدی با نتایج پژوهش حاضر مشابهت داشت (13). ولکر و همکاران در سال 2007 بیان کردند پارامترهای هماتولوژی در گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*) تحت تأثیر جیره حاوی سطوح مختلف پربیوتیک مانان الیگوساکارید قرار نگرفت که تا حدی منطبق با نتایج مطالعه حاضر بود (28). در آزمایشی توسط سادو و همکاران در سال 2008 افزودن مانان الیگوساکارید به جیره ماهی تیلاپیا منجر به افزایش سطح لکوسیت و تفاوت معنی داری در سایر پارامترهای هماتولوژیک در مقایسه با گروه شاهد نگردید (20).

پژوهش حاضر اگرچه میزان نوتروفیل، لنفوسیت و منوسیت در استراتژی مداوم پربیوتیکی در مقایسه با سایر تیمارها بالاتر بود اما تفاوت معنی داری را بدنبال نداشت. لکوسیت ها از مهمترین سلول هایی هستند که تولید آنتی بادی کرده و می توانند به صورت بیگانه خواری نقش خود را ایفا نمایند. افزایش در تعداد لکوسیت به علت وجود گلوکان است که می تواند گیرنده های مخصوص بر روی WBCs را شناسایی نماید (25). زمانی که بتا 1 و3 گلوکان بر روی این گیرنده ها قرار می گیرد، سلول ها شروع به بلعیدن باکتری ها و

ترشح سیتوکینین ها می نمایند که در نهایت به تشکیل WBCs جدید منجر می شود (2).

اندرز و همکاران در سال 2009 با افزودن مانان الیگوساکارید به جیره غذایی ماهیان انگشت قد گونه راهو (*Labeo rohita*)، افزایش معنی داری را در تعداد گلبول سفید، گلبول قرمز، هموگلوبین، پروتئین سرم، آلبومین و گلوبولین در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پربیوتیک مانان الیگوساکارید در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نمودند (2). بنابراین محرکهای ایمنی می توانند با تأثیری که بر روی سیستم ایمنی بدن ایجاد کنند باعث مقاومت بیشتر آبزیان شده و تحت شرایط نامناسب محیطی که ممکن است با استرسهای خاصی همچون تنشهای شیمیایی، فیزیکی و عفونی همراه باشد مؤثر واقع شده و در نهایت افزایش بازده تولید را در پی داشته باشند.

دل ریو زاراگوزا و همکاران در سال 2011 با افزودن بتا 1و3 - 1و6 گلوکان با سطوح متفاوت 0/05 ، 0/1 و 0/5 درصد به جیره غذایی ماهی سرخو (*Lutjanus guttatus*) طی مدت 5 هفته گزارش نمودند که در هفته دوم و چهارم در سطوح 0/05 و 0/1 درصد افزایش معنی داری در میزان مونوسیت و نوتروفیل نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید اما در پایان هفته پنجم در تیمار 0/05 درصد تعداد گلبول سفید، لنفوسیت و نوتروفیل به طور معنی داری کاهش پیدا کرد ولی میزان گلبول سفید و ترومبوسیت در تیمار شاهد افزایش یافت (6).

بای و همکاران در سال 2010 اثر مقطعی بتاگلوکان و glycyrrhizin را در میگوی پاسفید غربی (*Litipenaeus vanamei*) بررسی و گزارش کردند استراتژی تغذیه ای مقطعی توانست افت ایمنی ناشی از تغذیه مداوم را کاهش دهد و بهترین استراتژی جهت افزایش ایمنی میگوی وانامی را استراتژی تغذیه با جیره حاوی پربیوتیک بمدت 2 روز و در ادامه تغذیه با جیره بدون پربیوتیک بمدت 5 روز و سپس ادامه این فرآیند تا هفته ششم پیشنهاد کردند ولی در تحقیق حاضر استراتژی مداوم نسبت به سایر استراتژیهای پربیوتیکی نتایج مطلوب تری را به دنبال داشت که اختلاف گونه و سایر عوامل موجود را می توان از دلایل این تفاوت دانست (3).

در پژوهشی دیگر یی و همکاران در سال 2011 اثرات سطوح مختلف پربیوتیک های فروکتو الیگوساکارید، مانان الیگوساکارید و *Bacillus clausii* را بر روی فاکتورهای کلسترول و تری گلیسرید کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) مورد بررسی قرار دادند و تفاوت معنی داری در بین تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نکردند که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت داشت (30).

برخلاف نتایج تحقیق حاضر؛ اضافه کردن مانان الیگوساکارید به جیره فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی نشان داده است که میزان گلبول قرمز، هماتوکریت و لنفوسیت که جزء فاکتورهای دفاعی بدن محسوب می شوند در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای حاوی پربیوتیک از افزایش بیشتری برخوردار بودند (18). فدایی (1392) گزارش کرد که افزودن 1/5 گرم در کیلوگرم الیگوساکارید گلوکان- مانان به جیره تجاری فیل‌ماهیان جوان پرورشی سبب شد فاکتورهای ایمنی نظیر تعداد کل گلبول‌های سفید، هموگلوبین، به طور معناداری در مقایسه با گروه شاهد بالاتر رود ولی شاخص‌های مونوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداند (7).

بر اساس یافته های موجود در این بررسی و یافته های دیگر پژوهشگران مشاهده می‌شود که فاکتورهایی مانند عوامل محیطی (فصول سال، شوری، دوره نوری، درجه حرارت، تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبزی، سیکل تولید مثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط تغذیه ای)، زمان نمونه گیری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش های اندازه گیری می‌توانند بر فعالیت های پارامترهای بیوشیمیایی خون تأثیر بگذارند و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شوند (29). همچنین فرمولاسیون جیره های غذایی، نوع مواد محرک سیستم ایمنی مورد استفاده اعم از اثر فردی و ترکیبی آنها، میزان مورد استفاده آن در جیره، روشهای مختلف اضافه کردن پربیوتیک به جیره، مدت تجویز و احتمالاً فلور میکروبی ویژه ای که قادر به استفاده از محرکهای ایمنی به عنوان سوبسترا هستند بطور قابل ملاحظه ای بر خصوصیات ریخت شناسی و ایمنی خون اثر می‌گذارند.

نتیجه گیری کلی

یافته های تحقیق حاضر، اضافه نمودن پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتا-1و3 - گلوکان با استراتژی تغذیه مداوم در سطح 1/5 گرم در کیلوگرم را در بهبود شاخصه های هماتولوژی و بیوشیمی پیشنهاد می‌کند لیکن بمنظور حصول اطمینان از اثرات مثبت این استراتژی تغذیه ای پیشنهاد می‌شود مطالعه ای در خصوص تأثیر آن بر سایر سطوح ایمنی در شرایط آزمایشگاهی و پرورشی و همچنین رویارویی با عوامل بیماریزا صورت پذیرد تا بتوان با قطعیت بیشتری در مورد استراتژی تغذیه ای این مکمل در ماهی قزل آلا و سایر آبزیان اظهار نظر کرد.

منابع

1- Akrami, R., A. Ghelichi, and E. Ahmadifar. 2011. Effect of Dietary Prebiotic Inulin on Hematological and

Biochemical Parameters of Cultured Juvenile Beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, 66(2):131-136. (In Persian).
2- Andrews, S. R., N. P. Sahu, A. K. Pal, and S. Kumar. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41:61-69.
3- Bai, N., W. Zhang, K. Mai, X. Wang, W. Xu, and H. Ma. 2010. Effects of discontinuous administration of β-glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 306:218-224.
4- Borges, A., L. V. Scotti, D. R. Siqueira, D. F. Jurinitz, and G. F. Wassermann. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology and Biochemistry, 30:21-25.
5- Cerezuela, R., A. Cuesta, J. Meseguer, and A. Esteban. 2008. Effect of inulin on Gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish and Shellfish Immunology, 24:663-668.
6- Del Rio-Zaragoza, O. B., E. J. Fajer-Avila, and P. Almazan-Rueda. 2011. Influence of β-glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of *dactylogyrid monogeneans*. Parasite Immunology, 33:483-494.
7- Fadaei, M. 2013. Effect of dietary oligosaccharide-mannan on growth performance, survival, body composition and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). M.Sc. Thesis. Zabol University, 85pp. (In Persian).
8- Feldman, B. F., J. G. Zinkl, and N. C. Jian. 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins publication, Canada: 1120-1125.
9- Fooks, L. J., and G. R. Gibson. 2002. Probiotic as a modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition, 1:39-49.
10. Ghobadi, Sh., A. Matinfar, Sh. A. Nezami, and M. Soltani. 2009. Influence of supplementary enzymes Avizyme on fish meal replacement by soybean meal and its effects on growth performance and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries, 3(2):11-22. (In Persian).
11- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125:1401-1412.
12- Hardy, R.W. 2000. Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Webster, C.D and Lim, C.E. (eds.) Nutrient requirements and feeding of Finfish for aquaculture .CABI Press, Boca Raton, pp:105-121.
13- Hisano, H., M. M. Barros, and L. E. Pezzato. 2007. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-Nilo (OREOCHROMIS NILOTICUS). Aspectos hematológicos. Boletim do Instituto de Pesca, 33:35-42.
14- Houston, A. H. 1990. Blood and circulation. In: Methods for fish biology. Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). American fisheries Society, Bethesda, Bethesda, Maryland. USA. P: 273-334.
15- Krajnovic-Ozretic, M. 1991. Hematological and biochemical characteristics of reaed sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.). Acta Biol. Jogosl. Ichtyologia. 23:25-34.
16- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler, and F. Ollevier. 2005. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*) .Aquaculture International, 14:219-229.
17- Notash, S. H., S. Naimi Karaudi, H. Shahabzadeh, and F. Fadaeifard. 2011. Effect of probiotic protexin on growth, survival and feed conversion rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Modified Veterinary Research, 1(3):10-33. (In Persian).
18- Razeghi Mansour, M., R. Akrami, Sh. Ghobadi, K. Amani Denji, N. Ezatrahimi, and Gharaei. A. 2011. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish Physiology and Biochemistry, 38:829-835.
19- Ross, L. G., and B. Ross. 1999. Anasthetic and sedative techniques for aquatic animals. 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK. 22-57.
20- Sado, R. J., A. J. D. A. Bicudo, and J. E. P. Cyrno. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharid to juvenile nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. Journal of World Aquaculture Society, 39:821-826.
21- Savage, T. F., E. I. Zakrzewsla, and J. R. Andreasen. 1997. The effect of feeding oligosaccharide supplemented diets to poult on performance and morphology of the small intestine. Poultry Science, 76, 139P.
22- Schley, P. D., and C. J. Field. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. British Journal of Nutrition, 87:221-230.
23- Shoaei, R., R. Akrami, Sh. Ghobadi, M. Razeghi Mansour, and K. Amani Denji. 2012. The effect of dietary prebiotic Mannan oligosaccharide and β-1, 3 glucan (TechnoMos®) on hematological and biochemical parameters of juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics, 1:41-54. (In Persian).
24- Svetina, A., Z. Matasin, A. Tofant, M. Vucemilo, and N. Fijan. 2002. Haematology and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. Acta Veterinaria Hungarica, 50:459-467.
25- Ta'ati, R., M. Soltani, M. Bahmani, and A. A. Zamini. 2011. Growth performance, carcass composition and

immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Iranian Journal of Fisheries Science, 10:324-335.

26- Tangestani, R., E. Alizadeh Doughikollaee, E. Ebrahimi, and P. Zare. 2011. Effects of Garlic Essential oilas an Immunostimulant on Hematological Indices of Juvenile Beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, 66(3):209-216. (In Persian).

27- Tavares-Dias, M., and F. R. Moraes. 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. Journal of Fish Biology, 71:383-388.

28- Welker, T. L., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy, R. Shelby, and P. H. Klesius. 2007. Immune response and resistance to stress and EDWARDSIELLA ICTALURI, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. Journal of World Aquculture Society, 38:24-35.

29- Williams, R. W., and M. C. Warner. 1976. Some observation on the stained blood cellular elements of *Ictalurus punctatus*. Journal of Fish Biology, 9:491-497.

30- Ye, J. D., K. Wang, F. D. Li, and Y. Z. Sun. 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture Nutrition, 17:902-911.