اثر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) بر پاره‌ای از فاکتورهای خونی تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)

- **علیرضا رضوانی گیل‌کلائی***: گروه بهداشت، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- **بابک شعیبی‌عمرانی**: گروه بهداشت، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- **رضا صفری**: پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، صندوق پستی: ۹۶۱
- **فرناز مشایخی**: گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۵

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر برخی از پارامترهای خونی تاس‌ماهی سیبری با وزن ۳۵-۴۰ گرم بود. تعداد ۲۴۰ عدد ماهی به‌صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ ونیرو توزیع و با چهار تیمار غذایی حاوی 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} سلول پروبیوتیک در هر گرم جیره و تیمار شاهد فاقد پروبیوتیک در سه تکرار به‌مدت ۶۰ روز تغذیه شدند و در روزهای ۳۰ و ۶۰ مورد آزمایش قرار گرفتند. ارزیابی پارامترهای خونی نشان داد که در اکثر تیمارها افزایش در برخی پارامترهای مربوط به گلبول قرمز مثل هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین(HB) و متوسط حجم گلبول‌های قرمز (MCV) مشاهده شده، ولی اختلاف معنی‌دار وجود نداشته است. تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و میزان لنفوسیت (LYM) در همه تیمارها و تیمار شاهد بعد از ۶۰ روز کاهش یافت و بیش‌ترین میزان کاهش مربوط به تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری بود. به هنگام استفاده از لوگ ۸ پلانتاروم، میزانMCH و MCHC کاهش داشته که فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است. بنابراین مطالعه حاضر نشان داد که افزودن باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره‌غذایی تاس‌ماهی سیبری می‌تواند اثر مطلوبی بر فاکتورهای خونی آن‌ها داشته باشد.

کلمات کلیدی: تاس‌ماهی سیبری، فاکتورهای خونی ، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، پروبیوتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alireza_rezvani۶۳@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری به یک فعالیت مهم اقتصادی در بسیاری از کشورها تبدیل شده است. همراه با رشد آبزی‌پروری، مشکلاتی نظیر شیوع بیماری، اختلالات فیزیولوژیک، کنترل کیفیت آب به‌وجود آمد. از روش‌های سنتی به‌منظور کنترل بیماری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی است. مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌ها خود باعث بروز مشکلاتی نظیر بالا رفتن هزینه تولید (Al-Dohail و همکاران، ۲۰۰۹)، انباشتگی در محیط و در نتیجه آلوده کردن محیط (Al-Dohail و همکاران، ۲۰۰۹؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۸)، انباشتگی در بدن آبزی (Nik Khoo و همکاران، ۲۰۱۰) و در نهایت به ایجاد سویه‌های مقاوم در بدن میزبان (He و همکاران، ۲۰۱۱) اشاره کرد. علاوه بر موارد مذکور، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد شیمیایی سبب استرس‌های زیاد در آبزیان می‌گردد (Son و همکاران، ۲۰۰۹). به‌همین دلیل در دهه‌های اخیر به‌جای استفاده از داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها از مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها استفاده می‌کنند. در واقع پروبیوتیک‌ها مکمل غذایی میکروبی زنده است که با بهبود تعادل میکروارگانیسم‌های روده، اثرات مفیدی بر میزبان دارد (Wang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Fuller، ۱۹۸۷). از پروبیوتیک‌ها در مزارع پرورش آبزیان (نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ماهی‌ها) برای بهتر کردن کیفیت محیط‌زیست آبزی، افزایش میکروفلورهای مفید در لوله گوارش ماهی و از نظر تغذیه‌ای به‌منظور بهبود جذب غذا با تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ویتامین‌ها استفاده می‌شود (Iranito و Austin، ۲۰۰۲). پروبیوتیک‌ها با کاهش میزان بیماری‌ها و دوره‌های آن‌ها و هم‌چنین بالابردن سیستم ایمنی بدن و خاصیت ضدویروسی که دارند موجب کاهش تلفات و جلوگیری از ضرر و زیان اقتصادی می‌گردند (Fuller، ۱۹۸۹). پروبیوتیک‌ها انواع مختلفی دارند که از آن‌ها می‌توان به برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مخمرها و باکتریوفاژها اشاره کرد (Iranito و Austin، ۲۰۰۲). پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باکتری گرم مثبت است که جزو گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک طبقه‌بندی می‌شود که در این تحقیق از این باکتری به‌عنوان پروبیوتیک استفاده شده است.

ماهیان خاویاری یکی از با ارزش‌ترین گونه‌های آبزیان به‌شمار می‌رود به‌دلیل این‌که هم از نظر گوشت و هم خاویار ماهیان با ارزشی به‌شمار می‌روند. تاس‌ماهی سیبری یک گونه وارداتی است و به آسانی با شرایط اسارت و پرورش سازگار می‌شود. سرعت رشد بالایی دارد و به‌خوبی تغییرات را تحمل می‌کند. تاس‌ماهی سیبری به‌راحتی غذای دستی را می‌پذیرد و در سن پایین بالغ می‌شود، از این‌رو خاویاردهی سریعی دارد (Pyka و Kolman، ۲۰۰۳).

در این تحقیق به بررسی شاخص‌های خونی پرداخته که بررسی این شاخص‌ها روش مناسبی به‌منظور ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان می‌باشند (Asadi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Houston، ۱۹۹۷) و براساس یافته‌های حاصل از مطالعات انجام گرفته متاثر از مکمل‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها هستند (Brunt و Austin، ۲۰۰۵؛ Iranito و Austin، ۲۰۰۲). علاوه بر این بررسی شاخص‌های خونی به‌عنوان ابزاری در شناسایی بیماری‌ها و تعیین وضعیت بهداشتی و سلامت ماهیان می‌تواند به‌کار رود (جمیلی و همکاران، ۱۳۸۷).

از جمله پژوهش‌های انجام گرفته در خصوص اثرات جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت پروبیوتیک‌ها روی فاکتورهای خونی ماهیان می‌توان به تحقیقات ناصری و همکاران (۱۳۸۷) در لارو ماهی قزل آلای رنگین‌کمان، بینایی و همکاران (۱۳۹۰) در فیل ماهی پرورشی، حسینی و همکاران (۱۳۹۳) در بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، کامکار و همکاران (۱۳۹۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، Al-Dohail (۲۰۰۹) در گربه ماهی آفریقایی پرداختند، اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه پروبیوتیک: پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از باکتری‌های اسیدلاکتیک است. سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد استفاده در این آزمایش PTCC ۱۰۵۸ است. این باکتری به‌صورت تجاری (لیوفیلیزه) تهیه گردید. استوک مورد استفاده برای آزمایشات *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه می‌شود.

برای تهیه لگاریتم‌های مورد نظر، باکتری پروبیوتیک پودر شده به محیط کشت مایع TSB اضافه شد. سپس آن را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت قرار داده تا کدر شود و بعد در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده می‌شود. مایع باقی‌مانده رویی را دور ریخته و ۳ بار دیگر سانتریفیوژ کرده و در مرحله آخر مقداری سرم فیزیولوژی به آن اضافه شد تا سوسپانسیون شود و به رنگ کدر در آید. سپس با استفاده از لوله‌های استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^8$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) لوگ‌های ۷، ۸ و ۹ باکتری، تهیه شده و به جیره غذایی ماهی اضافه می‌گردد.

تهیه جیره: برای انجام این آزمایش از خوراک ماهی اکسترود GF_1 استفاده شد. این جیره برای ماهیان قزل‌آلا طراحی شده بود،

اما از آن‌جاکه پلت‌ها حالت فروروندگی سریع داشتند و مهم‌تر این‌که ارزش غذایی این جیره مناسب بود، بنابراین برای پیشبرد سریع‌تر کار از آن استفاده شد.

برای تهیه جیره آزمایشی، میزان تعیین شده از سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک، بر روی جیره غذای ماهیان اسپری شد. در حین اسپری‌کردن محلول سوسپانسیون بر روی غذا، با قاشق‌های پلاستیکی مخلوط شد تا باکتری‌ها توزیع یکنواختی در غذا داشته باشند.

طراحی آزمایش: تعداد ۲۴۰ عدد ماهی خاویاری سیبری با متوسط وزن ۴۰-۳۵ گرم در ۱۲ ونیرو تهیه گردید (۲۰ قطعه بچه ماهی در هر ونیرو). به‌منظور بررسی فاکتورهای خونی، ابتدا سوسپانسیونی از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تهیه شده و پس از مقایسه با لوله‌های استاندارد ۰/۵ مک فارلند، لوگ‌های ۷، ۸ و ۹ باکتری تهیه شد و به جیره‌غذایی ماهی اضافه شد. باید دقت نمود که دوز نهایی باکتری در هر گرم از غذای ماهی به حدود لوگ ۷، ۸ و ۹ برسد (سه تیمار). برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. غذادهی به‌صورت ۲ بار در روز صورت می‌گرفت. ماهیان به‌میزان ۲ درصد وزن بدنشان تغذیه می‌شدند. پس از اضافه نمودن پروبیوتیک به غذا، تغییرات فاکتورهای خونی تا ۶۰ روز و به فواصل زمانی ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری فاکتورهای هماتولوژی: در روز ۳۰ و ۶۰ از آزمایش، به‌صورت کاملاً تصادفی از هر وان ۵ عدد ماهی برای خون‌گیری خارج شد. خونگیری به‌وسیله سرنگ ۲ سی‌سی از قسمت ورید دمی ماهیان صورت گرفت. سپس درون تیوب‌های اپندروف غیرهپارینه برای انجام مطالعات منتقل شدند. نمونه‌های خون به آزمایشگاه خون‌شناسی پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر برای ارزیابی شاخص‌های خونی که شامل اندازه‌گیری پارامترهای مربوط به گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید انتقال یافت.

تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از طریق لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ پس از رقیق‌سازی خون به‌وسیله بافر فسفات نمکی شمارش شدند. برای اندازه‌گیری هماتوکریت (HCT) از لوله‌های مویین هماتوکریت و دستگاه سانتریفیوژ هماتوکریت استفاده شد. میزان متوسط حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، متوسط وزن هموگلبولین در هر گلبول‌های قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلبولین سلولی (MCHC) از طریق فرمول محاسبه شدند (Asadi و همکاران، ۲۰۱۲). هموگلوبین (HB) به‌وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون و به روش کلرومتریک با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. فرمول محاسبه میـزان متوسط حجم گلبول‌های قرمز:

$$MCV = (Hct\times ۱۰۰۰) / RBC(۱۰^{۶}\ mm^{-۳})$$

فرمول محاسبه متوسـط هموگلبولین گلبول‌های قرمز

$$MCH=Hb(gdl^{-۱})/RBC(۱۰^{۶}mm^{-۳})$$

فرمول محاسبه متوسط غلظت هموگلبولین سلولی: $MCHC=Hb/Hct$

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا از آزمون شاپیرو ویک (Shapiro wilk) به‌منظور آزمون نرمال بودن داده‌ها استفاده شده و با توجه به نرمال بودن داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه Anova جهت ارتباط معنی‌داری مابین داده‌های هر گروه و از آزمون دانکن جهت تائید نهایی تست آنالیز واریانس استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار با ضریب اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ و ۰/۰۱ تعیین گردید.

نتایج

برای نشان‌دادن اثر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر فاکتورهای خونی تاس‌ماهی سیبری، فاکتورهای مربوط به گلبول‌های قرمز و گلبول های سفید محاسبه شد.

نتایج فاکتور خونی مربوط به گلبول قرمز: نتایج آنالیز پارامترهای هماتولوژی که شامل میزان هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HB)، متوسط حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، متوسط وزن هموگلوبین در هر گلبول‌های قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) مربوط به گلبول قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج به‌دست آمده از بررسی تیمارهای حاوی لوگ ۸ باکتری نشان‌دهنده آن است که میزان HCT، HB و MCV افزایش نسبی داشته و میزان MCH و MCHC کاهش داشته‌اند ولی با این وجود اختلاف معنی‌دار در ماه‌های اول و دوم آزمایش مشاهده نشده است ($p>۰/۰۵$). بررسی تیمار حاوی لوگ ۷ باکتری نشان داد که تمامی پارامترها دارای روند صعودی بوده ولی با این وجود اختلاف موجود در ماه‌های اول و دوم معنی‌دار نبوده است ($p>۰/۰۵$). بررسی تیمار حاوی لوگ ۹ باکتری، نشان داد که تمامی پارامترها دارای روند صعودی بودند و اختلاف ما بین MCV، MCH و MCHC در ماه‌های اول و دوم معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). بررسی تیمار شاهد نشان داد که تمامی پارامترها به‌طور جزئی افزایش داشتند ولی اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها در ماه‌های اول و دوم مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

نتایج فاکتور خونی مربوط به گلبول سفید: نتایج آنالیز پارامترهای هماتولوژی که شامل میزان تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، لنفوسیت (Lym)، نوتروفیل (Neut)، رادیکال آزاد اکسیژن (O^-) در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی نتایج به‌دست آمده از تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری نشان داد که تعداد نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$). بررسی

نتایج به‌دست آمده از تیمار حاوی لوگ ۷ باکتری نشان داد که مقادیر تعداد گلبول سفید روند کاهشی داشته ولی میزان رادیکال آزاد افزایش معنی‌دار داشته است (p<۰/۰۵). در تیمار حاوی لوگ ۹ باکتری نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بوده است (p<۰/۰۵). در تیمار شاهد کاهش و یا افزایش نسبی برخی از پارامترها در ماه دوم معنی‌دار نبوده است.

جدول ۱: پارامترهای مربوط به گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ماهی سیبری در پایان آزمایش

شاخص‌ها	جیره های حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*			
	لوگ ۷	لوگ۸	لوگ ۹	شاهد
هماتوکریت (گرم در دسی‌لیتر)	۳۲/۶۷±۳/۱۳	۳۵±۲/۶۴	۳۴/۶۷±۳/۵۱	۳۴/۶۷±۲/۳
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۸/۰۸±۰/۳۱	۵/۰۶±۰/۴۱	۵/۷۴±۰/۳۶	۴/۷۵±۰/۳۷
متوسط حجم گلبول‌های قرمز (فمتولیتر)	۲۹۵/۷۵±۳۸/۰۹	۳۰۵/۶۷±۳۴/۴۵	۳۶۳/۳۸±۳۹/۰۲	۳۵۲/۳۳±۳۶/۰۳
متوسط وزن هموگلوبین در هر گلبول‌های قرمز (پیکوگرم)	۷۲/۰۶±۴/۳۳	۴۴/۲±۴/۳۴	۶۰/۲۹±۵/۱۳	۴۸/۳۵±۶/۰۸
متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (درصد)	۲۵/۰۸±۰/۳۲	۱۴/۵۷±۰/۱۴	۱۶/۶۰±۰/۷۹	۱۳/۷۱±۰/۱۶

جدول ۲: پارامترهای مربوط به گلبول سفید در تیمارهای مختلف ماهی سیبری در پایان آزمایش

شاخص‌ها	جیره‌های حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*			
	لوگ ۷	لوگ۸	لوگ ۹	شاهد
تعداد گلبول‌های سفید (سلول در هر میلی‌لیتر)	۱۵۰۶۷±۶۱۲	۱۵۰۶۷±۶۳۱	۱۲۷۳۳±۵۲۳	۱۰۲۶۷±۵۰۴
لنفوسیت (درصد)	۹۸±۳/۱۶	۹۵±۳/۱۹	۹۶/۳۳±۳/۰۲	۹۸/۶۶±۳/۴
نوتروفیل (درصد)	۲±۱/۰۴	۵±۰/۹۱	۳/۶۶±۱/۰۶	۱/۳۳±۰/۰۵
رادیکال آزاد اکسیژن (واحد نسبی نور در ثانیه)	۲۹۱۴/۲±۱۶۱/۱۳	۲۶۸۰/۴±۱۶۷/۷۱	۱۹۶۵/۲±۱۷۲/۶۵	۱۲۹۲/۹±۱۷۴/۵۱

بحث

خون، به‌عنوان یک بافت سیال یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردند (حسینی و همکاران، ۱۳۹۳). لذا در اختیار داشتن مقادیر طبیعی پارامترهای خونی و بررسی چگونگی تغییرات آن‌ها در بیماری‌های مختلف همواره از ابزارهای مهم تشخیص در بسیاری از بیماری‌های آبزیان بوده است. شاخص‌های خونی در ماهیان می‌تواند متاثر از مواردی چون گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و رژیم غذایی باشد (Brunt و همکاران، ۲۰۰۵). فرمولاسیون جیره‌های غذایی، نوع پروبیوتیک مصرفی، درجه خلوص پروبیوتیک مصرفی، روش‌های مختلف اضافه کردن به جیره به‌طور قابل ملاحظه‌ای بر خصوصیات ریخت‌شناسی خون اثر می‌گذارند.

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به جیره‌غذایی تاس‌ماهی سیبری از نظر میزان HCT و Lym بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. احتمالاً عدم معنی‌داری درصد هماتوکریت در تیمارها با گروه شاهد در وضعیت غذایی و بهداشتی ماهیان و در نتیجه کاهش حجم خون ماهیان توجیه کرد (ستاری، ۱۳۸۱). از نظر تعداد گلبول سفید تیمارهای آزمایشی با مصرف پروبیوتیک سیستم ایمنی آن‌ها تحریک می‌شود و بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید مربوط به تیمارهای ۷ و ۸ باکتری بود و در پایان دوره آزمایش بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. از نظر میزان هموگلوبین بین تیمار شاهد و تیمار حاوی لوگ ۷ و ۹ باکتری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد و بیش‌ترین میزان هموگلوبین در تیمار حاوی لوگ ۷ باکتری مشاهده شد. از نظر میزان MCHC بین تیمار شاهد و تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی سایر تیمارها با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند.

مطالعات انجام گرفته توسط Brunt و همکاران (۲۰۰۵)، نشان داد که با افزودن پروبیوتیک باعث افزایش گلبول‌های سفید می‌شود. بنابراین نوع باکتری مورد استفاده و ویژگی‌های آن تاثیر متفاوتی بر تعداد گلبول‌های سفید خواهند داشت.

در مطالعه حاضر تیمارهای حاوی لوگ‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث افزایش رادیکال آزاد اکسیژن نسبت به تیمار شاهد

شدند. رادیکال آزاد اکسیژن در ارتباط مستقیم با انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها می‌باشد. بنابراین متعاقب افزایش نوتروفیل‌ها رادیکال آزاد اکسیژن نیز افزایش می‌باشد.

در مطالعه مروری که توسط Nayak و همکاران (۲۰۰۷) ارائه شده، گزارش شد که پروبیوتیک‌های مختلف که به‌صورت ترکیبی و یا منفرد مورد استفاده قرار می‌گیرند باعث افزایش انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها، فاگوسیتوزیس شده و در حقیقت سیستم ایمنی ذاتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات مختلف نشان داد که به دنبال استفاده از باکتری‌های دارای خواص پروبیوتیک نظیر باسیلوس‌ها و باکتری‌های گروه لاکتیک، فعالیت انفجار تنفسی افزایش می‌یابد (Xu و همکاران، ۲۰۰۹؛ Salinas و همکاران، ۲۰۰۵؛ Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۳).

کامکار و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تأثیر *باسیلوس سوبتیلیس* به‌عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند. به‌طوری‌که از ۲ گروه شامل شاهد و تیمار استفاده شد. درگروه شاهد، پروبیوتیک تجویز نشد اما در گروه تیمار، *باسیلوس سوبتیلیس* با دوز ۱۲۴ سلول به‌ازای هر گرم غذا تجویز گردید. پس از انجام آزمایشات، تجزیه و تحلیل یافته‌ها نشان داد که افزودن *باسیلوس سوبتیلیس* در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر میزان گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول‌های قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی تأثیری نداشت و بین میزان فاکتورهای مذکور در دو گروه اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$) در حالی‌که در یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، متوسط حجم گلبول‌های قرمز در همه تیمارها افزایش داشته و میزان گلبول‌های قرمز به‌جز در تیمار حاوی لگاریتم ۹ در بقیه تیمارها افزایش داشته و میزان متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی به‌جز در تیمار حاوی لگاریتم ۸ در بقیه تیمارها افزایش داشته است. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی تاثیر *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت در گروه تیمار به‌طور معنی‌داری بزرگ‌تر از گروه شاهد بود ($p<0/05$) و درصد نوتروفیل و مونوسیت در گروه شاهد به‌طور معنی داری بزرگ‌تر از گروه تیمار بود ($p>0/05$). اما در تحقیق حاضر، تعداد گلبول‌های سفید، آلبومین و نوتروفیل در گروه تیمارها بیش‌تر از گروه شاهد بود و میزان لنفوسیت در گروه شاهد بیش‌تر از تیمارها بود و مونوسیت هم در تیمارها مشاهده نشد.

در بررسی صورت گرفته توسط بینایی و همکاران (۱۳۹۰)، ۲۴۰ عدد فیل ماهی یک‌ساله در یک دوره ۱۲ هفته با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرمی به‌ازای هر کیلوگرم وزن جیره با پروبیوتیک تجاری باکتوسل(®Bactocell) تغذیه شده و فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی فیل‌ماهی پرورشی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد کل گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با شاهد از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است، لیکن میزان گلبول‌های سفید در دوز ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت.

در مطالعه‌ای اثر پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی بر پارامترهای خونی فیل‌ماهی جوان پرورشی که توسط حمیدیان و همکاران (۱۳۹۲) انجام شد به این نتیجه رسیدند که سطوح مختلف پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی تاثیری بر پارامترهای خونی ندارد، آن‌ها نشان دادند که با افزایش میزان پروبیوتیک تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید افزایش می‌یابد، آنتی‌بادی‌های مخاط تاثیری ندارد که با مطالعه حاضر در تضاد بود. در مطالعه حاضر با افزودن پروبیوتیک به جیره بعد از ۶۰ روز افزایش قابل توجهی در تعداد لنفوسیت‌ها مشاهده شد، با این حال این روند افزایش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود.

هم‌چنین مطالعات بیش‌تری می‌بایست به‌منظور تعیین اثرات پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر فیزیولوژی دستگاه گوارش و آنزیم‌های گوارشی از جمله آمیلاز، پروتئاز و لیپاز صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و مجتمع بازسازی ذخایر شهید رجایی (ساری) که در طول انجام این تحقیق امکانات و شرایط مناسب را برای اجرای موفقیت آمیز این پروژه فراهم نمودند تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. **بینایی، م.؛ قیاسی، م.؛ پورغلام، ر.؛ نقوی، ع.ر. و سعیدی، ع.ا.، ۱۳۹۰.** بررسی فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی و ایمنی فیل‌ماهی پرورشی تغذیه شده با پروبیوتیک باکتوسل (®Bactocell). کتابچه خلاصه مقالات اولین همایش ملی آبزی‌پروری ایران، بندرانزلی. ۴۶۱ صفحه.

۲. **جمیلی، ش.؛ ماشینچیان‌مرادی، ع.؛ بهمنی، م. و کیائی ضیابری، ک.، ۱۳۸۷.** بررسی و شناخت فاکتورهای خونی اردک ماهی تالاب انزلی. اولین همایش ملی علوم و شیلات و آبزیان ایران، لاهیجان. صفحات ۳۷ تا ۳۹.

۳. **حسینی، ع.؛ اورجی، ح.؛ یگانه، س. و شهابی، ع.، ۱۳۹۳.** تاثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی روی رشد، فاکتورهای

خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۳، شماره ۲، صفحات ۳۵ تا ۴۵.

۴. **حمیدیان، ن.، ۱۳۹۲.** ارزیابی اثر *Pediococcus acidilactici* بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی فیل ماهی (*Huso huso*). همایش ملی علوم جانوران آبزی. رشت، دانشگاه گیلان. صفحات ۲۳۱ تا ۲۴۵.

۵. **ستاری، م.، ۱۳۸۱.** کتاب ماهی‌شناسی (۱) تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر دانشگاه گیلان. صفحات ۱۰۵ تا ۱۷۶.

۶. **کامکار، م.؛ قانع، م.؛ پورغلام، ر. و قیاسی، م.، ۱۳۹۴.** تأثیر *Bacillus subtilis* به‌عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌دنبال عفونت تجربی با *Streptococcus iniae*. نشریه توسعه آبزی‌پروری دانشگاه آزاد لاهیجان. سال ۶، شماره ۱، صفحات ۹۱ تا ۱۰۲.

۷. **ناصری، س.، ۱۳۸۷.** بررسی تأثیر پروبیوتیک‌ها و آهن بر رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۲۵ صفحه.

۸. **Al-Dohail, M.A.; Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M., ۲۰۰۹.** Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell ۱۸۲۲) fingerling. Aquaculture Research. Vol. ۴۰, pp: ۱۶۴۲-۱۶۵۲

۹. **Asadi, F.; Rostami, A.; Pourkabir, M. and Shahriari, A., ۲۰۰۶.** Serum lipid and lipoprotein profile of Asian tortoise (*Agrionemys horsfieldi*) in prehibernation state. Comparative Clinical Pathology. Vol. ۱۶, No. ۳, pp: ۱۹۳-۱۹۵.

۱۰. **Brunt, J. and Austin, B., ۲۰۰۵.** Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. of Fish Disease. Vol. ۲۸, pp: ۶۹۳-۷۰۱.

۱۱. **Fuller, R., ۱۹۸۹.** Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. Vol. ۶۶, pp: ۳۶۵-۳۷۸.

۱۲. **Fuller, A. and Wayne, A., ۱۹۸۷.** Measurement Error Models. John Wiley and Sons, New York.

۱۳. **He, S.; Liu, W.; Zhou, Zh.; Wei Mao, W.; Ren, P.; Marubashi, T. and Ringo, E., ۲۰۱۱.** Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-۳۱۰۲ as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture research & development.

۱۴. **Houston, H., ۱۹۹۷.** Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? American Fish Society. Vol. ۱۲۶, pp: ۸۷۹-۸۹۴.

۱۵. **Irianto, A. and Austin, B., ۲۰۰۲.** Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. Vol. ۲۵, pp: ۳۳۳-۳۴۲.

۱۶. **Nayak, S.K.; Swain, P. and Mukherjee, S.C., ۲۰۰۷.** Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham): Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۲۳, pp: ۸۹۲-۸۹۶.

۱۷. **Nikkhoo, M.; Yusefiyan, M. and Safari, R., ۲۰۱۰.** Effect of aqualase as a probiotic on growth and survival of Cyprinidae (*Cyprinus carpio*). Marine science and technology.(translated in Persian)

۱۸. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M., ۲۰۰۳.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol. Vol. ۱۵, pp: ۴۴۳-۴۵۲.

۱۹. **Pyka, J. and Kolman, R., ۲۰۰۳.** Feeding intensity and growth of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandet in pond cultivation. Archives of Polish Fisheries. Vol. ۱۱, pp: ۲۸۷-۲۹۴.

۲۰. **Salinas, I.; Cuesta, A.; Esteban, M.A. and Meseguer, J., ۲۰۰۵.** Dietary administration of *Lactobacillus delbriieckii* and *Bacillus substilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish Shellfish Immunol. Vol. ۱۹, pp: ۶۷-۷۷.

۲۱. **Son, V.M.; Chang, Ch.Ch.; Wu, M.Ch.; Guu, Y.K.; Chiu, Ch.H. and Cheng, W., ۲۰۰۹.** Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinepheluscoioides. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۲۶, pp: ۶۹۱-۶۹۸.

۲۲. **Wang, Y.B.; Li, J.R. and Lin, J., ۲۰۰۸.** Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture. Vol. ۲۸۱, pp: ۱-۴.

۲۳. **Xu, B.; Wang, Y.; Li, L. and Lin, Q., ۲۰۰۹.** Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish Physiology Biochem. Vol. ۳۵, pp: ۳۵۱-۳۵۷.