

## اثرات پروبیوآنزیم تغذیه‌ای بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- ابوالحسن راستیان‌نسب: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- سیدمحمد موسوی\*: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- حسین ذوالقرنین: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- همایون حسین‌زاده‌صحافی: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۶

### چکیده

با هدف بررسی تاثیر پروبیوآنزیم تغذیه‌ای بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمارهای ۱: گروه تغذیه شده با غذای بدون پروبیوآنزیم، ۲: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا و ۳: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا، با ۳ تکرار، طی مدت ۶۰ روز با هم مقایسه شدند. تعداد ۳۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $26/3 \pm 2/7$  گرم در هر یک از مخازن فایبر گلاس ۲۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. در انتهای دوره، شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و پاسخ‌های ایمنی سنجش گردیدند. براساس نتایج، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۲ و ۳ با تیمار ۱ در شاخص‌های رشد، تغذیه و شاخص‌های خونی گلبول قرمز مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). ولی میانگین تعداد گلبول‌های سفید و نیز درصد گلبول‌های نوتروفیل در تیمار ۳ با اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بیش‌تر از گروه ماهیان شاهد بود. اجزای کمپلمان در سرم ماهیان تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر بود ( $P < 0/05$ ). فعالیت راه میانبر کمپلمان و ایمنوگلوبولین (IgM) بین تیمارهای متفاوت، اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). میزان لایوزیم و گلوبولین کل در ماهیان تیمار ۳ به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در مقایسه با تیمار شاهد بیش‌تر بود. براساس نتایج، تاثیر قابل توجه پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه مشاهده نگردید. با این وجود، براساس یافته‌ها می‌توان گفت پروبیوآنزیم مورد استفاده، دارای اثر ایمنی‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوآنزیم، رشد، ایمنی



## مقدمه

تخریب باکتری‌ها در تمام نقاط بدن بوده و بخشی از سیستم دفاع غیراختصاصی جانوران محسوب می‌گردد. در آزادماهیان، لیزوزیم در سرم، ترشحات و لایه‌های موکوسی و بافت‌های غنی از گلبول‌های سفید به‌ویژه دستگاه گوارش و کلیه وجود دارد (Grinde و همکاران، ۱۹۸۸؛ Lie و همکاران، ۱۹۸۹). ظاهراً منبع اصلی تولید لیزوزیم مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها می‌باشد. با این‌حال، بررسی‌ها وجود این آنزیم را در گرانول‌های گلبول‌های ائوزنوفیل دستگاه گوارش ثابت نموده است (Sveinbjornsson و همکاران، ۱۹۹۶). از آن‌جاکه مولکول‌های پادتن از دسته پروتئینی گلوبولین‌ها هستند و به‌خاطر نقش آن‌ها در ایمنی موجودات، به آن‌ها عموماً ایمنوگلوبولین می‌گویند. پیوند آنتی‌ژن خاص با پادتن باعث انسداد برخی فعالیت‌های مهم آنتی‌ژنی می‌شود و میزبان را در مقابل بیماری محافظت می‌کند (علیشاهی، ۱۳۸۸). پروبیوآنزیم‌ها ترکیبات دو بخشی بوده به‌طوری‌که، آنزیم‌ها عمل هضم را در معده و پروبیوتیک‌ها جذب غذا را در روده افزایش می‌دهد. بخش عمده ترکیبات آنزیمی پروبیوآنزیم، بر شکستن و هیدرولیز پلی‌ساکاریدها متمرکز است (Pettersson، ۲۰۰۵). این آنزیم‌ها غالباً به‌وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌گردند (Partridge و Bedford، ۲۰۱۰).

با توجه به شیوع انواع بیماری‌ها، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت دارویی عوامل عفونی، مقاومت‌سازی گونه‌های پرورشی در مقابل عوامل عفونی از طریق محرک‌های ایمنی ضرورت داشته و در این راستا، اهداف مورد نظر در این پژوهش، تعیین اثرات پروبیوآنزیم به‌عنوان محرک ایمنی بر شاخص‌های تغذیه‌ای، رشد و شاخص‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در مخازن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰ لیتر انجام شد. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای  $17 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد با هوادهی به‌طور طبیعی و تعویض آب مخازن به صورت ثقلی به‌میزان  $0.3$  لیتر در ثانیه انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. پروبیوآنزیم مورد استفاده براساس میزان توصیه شده شرکت سازنده محصول به غذا اضافه گردید. تیمار ۱ (شاهد): گروه تغذیه شده با غذای بدون پروبیوآنزیم، تیمار ۲: گروه تغذیه شده با غذای حاوی  $0.3$  گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا و تیمار ۳: گروه تغذیه شده با غذای حاوی  $0.5$  گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا بود. به‌طور تصادفی تعداد ۳۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (یزدی‌صمدی و همکاران، ۱۳۷۶) به‌عنوان نسل دوم حاصل از تخم‌های چشم‌زده وارداتی از

کمبود منابع آبی و افزایش تقاضا برای آبزیان سبب شده است که پرورش انبوه و مترکم جایگزین روش‌های نیمه‌مترکم یا غیرمترکم گردد (رحمتی‌اندانی و همکاران، ۱۳۸۹). در پرورش مترکم، استرس‌هایی مانند اختلالات فیزیکی، شیمیایی و زیستی به‌صورت طبیعی در محیط زیست ماهی رخ می‌دهد. این استرس‌ها امکان ابتلای ماهی به انواع بیماری‌ها را افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که با توسعه این صنعت، بیماری‌های متعدد ویروسی و باکتریایی دامنگیر صنعت تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا گردیده است (Soltani و همکاران، ۲۰۱۴). از این‌رو، پرورش ماهیانی با سیستم ایمنی فعال و دارای قدرت مقابله با بیماری‌ها و مقاوم در برابر شرایط نامساعد محیطی، از اهمیت بالایی برخوردار است (Ulukoy و Kubulay، ۲۰۰۷). روش اساسی در مدیریت بهداشتی آبزیان باید بیش‌تر بر اتخاذ تدابیر پیشگیرانه استوار باشد تا کنترل یا درمان بیماری‌ها، زیرا این راهبرد از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر است (علیشاهی، ۱۳۸۸). تمایل به مصرف ترکیبات نظیر محرک‌های ایمنی، پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها و یا ترکیبات دوگانه (سین‌بیوتیک) حاوی این مواد و آنزیم‌ها نظیر پروبیوآنزیم‌ها در حال افزایش است (Ringo و همکاران، ۲۰۱۴). تا بتوان تولیدی پربازده و پایدارتر با استفاده از مواد طبیعی بدون استفاده از مواد شیمیایی عرضه نمود (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). سیستم ایمنی اختصاصی در حیوانات خونسرد به‌ویژه ماهی‌ها، کم‌تر توسعه یافته و بیش‌تر ایمنی غیراختصاصی وظیفه دفاعی را به‌عهده گرفته است این وضعیت ویژه باعث اهمیت خاص محرک‌های ایمنی به‌دلیل خاصیت تحریک ایمنی غیراختصاصی در ماهی شده است (Nakanishi و Iwama، ۱۹۹۶). انواع متفاوتی از محرک‌های ایمنی مطالعه شده‌اند اما تعداد کمی از آن‌ها به‌منظور استفاده در آبی‌پروری مناسب هستند (Raa و همکاران، ۲۰۱۴؛ Siwicki و همکاران، ۱۹۹۸) با این‌وجود، بررسی تاثیر پروبیوآنزیم‌ها بر وضعیت عمومی و سیستم ایمنی ماهی با تاکید بر اثبات تاثیر این ماده بر شاخص‌های خونی و تولید مولکول‌های دفاع ایمنی از قبیل لیزوزیم، ایمنوگلوبولین و عناصر سیستم کمپلمان اطلاعات مناسبی مبنی بر قابلیت این ترکیبات بر ایمنی‌زایی ماهی دارد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که مسیر آلترناتیو کمپلمان در پاسخ‌های ایمنی در ماهیان استخوانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Yano، ۱۹۹۶). در عفونت‌های باکتریایی، سیستم کمپلمان در اثر لیپوپولی‌ساکارید موجود در دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی فعال شده و با تولید کیموکین، ماکروفاژها و نوتروفیل‌های دارای گیرنده C3 را فعال نموده و با اتصال به باکتری‌ها عمل فاگوسیتوز را مهیا می‌سازد (Magnadottir و همکاران، ۲۰۰۵). لیزوزیم یک آنزیم فعال در

گردید. سنجش وزن ماهیان با نمونه برداری تصادفی و ۱۵ عدد ماهی از تکرارهای مختلف هر تیمار پس از بی‌هوشی با محلول پودر میخک با غلظت ۲۰۰ ppm زیست‌سنجی می شدند و داده‌های حاصل از اندازه گیری وزن ماهیان هر نمونه به منظور محاسبه میانگین وزن ماهیان و صفات رشد در هر تیمار ثبت می شدند (Ricker, ۱۹۷۹).

#### صفات مورد بررسی رشد: شاخص‌های رشد و تغذیه از طریق

روابط زیر محاسبه گردید.

افزایش وزن بدن (گرم) = وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

درصد افزایش وزن بدن =

اوزن نهایی بدن (گرم) - اوزن اولیه بدن (گرم) /  $100 \times$  اوزن اولیه بدن (گرم)

افزایش وزن روزانه (گرم) =

میانگین وزن نهایی بدن (گرم) - میانگین وزن اولیه بدن (گرم) / طول دوره پرورش (روز)

(Ricker, ۱۹۷۹)

درصد نرخ رشد ویژه =

لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن (گرم) - لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن (گرم) /  $100 \times$  طول

دوره پرورش (روز) (Qinghui و همکاران، ۲۰۰۴)

شاخص کبدی = اوزن کبد (گرم) / وزن نهایی بدن (گرم)  $100 \times$

نسبت تبدیل غذایی = میزان غذای داده شده (گرم) / میانگین افزایش وزن بدن (گرم)

بازده تبدیل غذایی = میانگین افزایش وزن بدن (گرم) / میزان غذای داده شده (گرم)

(Tacon, ۱۹۹۰)

ضریب کارایی پروتئین =

میزان افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار پروتئین جیره غذایی خورده شده (گرم)

(Ricker, ۱۹۷۹)

کل غذای مصرف شده = کل وزن غذای خورده شده / تعداد ماهی در هر مخزن

(Tacon, ۱۹۹۰)

#### اندازه‌گیری شاخص‌های خون شناسی و شمارش گلبولی:

اندازه‌گیری شاخص‌های خون شناسی آبیژان با اصلاحاتی از همان روش‌های معمول و متداول برای اندازه‌گیری شاخص‌های خون شناسی پستانداران استفاده می‌گردد (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). بدین منظور از هر تیمار ۶ عدد ماهی (۲ ماهی از هر تکرار) نمونه برداری شد (در مجموع ۱۸ عدد). ماهیان قبل از خون‌گیری توسط محلول پودر گل میخک (۲۰۰ ppm) بی‌هوش می‌شدند. خون‌گیری با سرنگ ۵ سی‌سی و سر سوزن شماره ۲۲ از ورید ساقه دمی صورت گرفت. ۰/۷ سی‌سی از خون به تیوپ‌های حاوی هپارین جهت مطالعات خون شناسی و شمارش گلبولی (Rajapakshe و Pathiratne, ۱۹۹۸) و ۱/۵ سی‌سی باقی‌مانده به لوله‌های معمولی جهت جداسازی سرم و مطالعه فاکتورهای ایمنی شناسی تخلیه می‌شد. سرم نمونه‌های خون با دو بار سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا و همراه با نمونه‌های خون در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل می‌شدند.

کشور فرانسه، با میانگین وزنی  $26/3 \pm 2/7$  گرم در هر یک از مخازن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. به منظور سازش پذیری ماهی‌ها، کلیه تیمارها به مدت دو هفته با غذای تجاری تغذیه شده و در طول این مدت ماهی‌ها از نظر وضعیت ظاهری، شنای طبیعی و تلفات بررسی می‌شدند. هم‌چنین، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دمای آب، اکسیژن محلول و pH کنترل می‌شد.

#### تهیه غذای آزمایش: در این مطالعه از ترکیب پروبیوآنزیم حاوی

باکتری‌های *Entrococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* و آنزیم‌های B-Glucanase، Alpha-Amylase 3.2.1.1، B-Glucanase 3.2.1.4، ۳،۲،۱،۶، B-Xylanase 3.2.1.8 و Protease به عنوان مکمل غذایی استفاده شده است. این محصول توسط شرکت XVET GmbH (آلمان) تولید و به سفارش سازمان دامپزشکی کشور توسط شرکت عرشیا دارو (تبریز) وارد می‌گردد. به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، غذای تجاری به صورت اکستروُد (Extroded) از شرکت فرادانه تهیه شد (جدول ۱).

#### جدول ۱: آنالیز ترکیبات جیره غالب مورد استفاده در آزمایش

| نوع غذا         |                   | ترکیبات (درصد) |      |            |        |
|-----------------|-------------------|----------------|------|------------|--------|
| GFT1 (غذای رشد) | اندازه (میلی‌متر) | پروتئین        | چربی | کربوهیدرات | خاکستر |
| ۴               | ۳۵                | ۱۶/۴۲          | ۳۰   | ۱۱/۲       |        |

مکمل به کمک محلول ژلاتین ۵ درصد با غذا مخلوط شد (Treves-Brown, ۲۰۰۰). برای این کار، ابتدا غذا با ترازوی دیجیتالی با دقت یک صدم توزین شد و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، پروبیوآنزیم به صورت محلول در آب و ژلاتین درآمده و با اسپری یکنواخت با غذا مخلوط شد. سپس جیره‌های آماده شده در هوای محیط و با رعایت نکات بهداشتی خشک شدند و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. لازم به ذکر است به جیره تیمار ۱ (شاهد) نیز به میزان یکسان با تیمارها، محلول ژلاتین ۵ درصد اسپری شد. ماهیان در ابتدا و انتهای دوره و هم‌چنین در طول دوره آزمایش زیست‌سنجی می‌شدند. غذادهی در شروع تغذیه براساس ۳ درصد وزن توده زنده ماهی در مخزن به صورت دستی انجام می‌شد. میزان غذای مورد نیاز هر روز به سه قسمت مساوی تقسیم می‌شد و سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۱ و ۱۷ در اختیار ماهیان قرار می‌گرفت. دوره تغذیه و پرورش به مدت ۶۰ روز انجام شد.

**زیست‌سنجی ماهیان:** به منظور ارزیابی میزان رشد ماهیان تیمارهای مختلف در ابتدا و انتها و دو بار در طول دوره ۶۰ روزه پرورش، نسبت به اندازه‌گیری وزن ماهیان با ترازوی دیجیتالی اقدام



تعداد کل گلبول‌های سفید در میکرولیتر خون =  $200 \times 10^6 \pm$  تعداد کل گلبول‌های سفید شمارش شده در ۹ مربع بزرگ) شمارش افتراقی گلبول‌های سفید: برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید اقدام به تهیه گسترش خون گردید برای این کار و قبل از مخلوط نمودن نمونه خون با ماده ضدانعقاد، مستقیماً یک قطره خون بر روی لام قرار می‌گرفت و اقدام به تهیه گسترش می‌گردید. گسترش‌های تهیه شده با الکل متیلیک تثبیت (فیکس) می‌گردید و سپس با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید و پس از پایان رنگ‌آمیزی و شستشوی لام و خشک شدن گسترش با عدسی روغنی تعداد یک‌صد سلول سفید مورد شمارش و درصد هریک از سلول‌ها محاسبه و ثبت می‌گردید (Pathiratne و Rajapakshe, ۱۹۹۸).

#### شاخص‌های ایمنی شناسی

**اندازه‌گیری لیزوزیم سرم:** فعالیت لیزوزیم سرم براساس روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) حساس به آنزیم لیزوزیم اندازه‌گیری شد. سه رقت از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ از ۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در بافر فسفات-سیترات ۰٫۱ مول، پ-هاس ۶، به‌عنوان استاندارد استفاده شد. محلول‌های استاندارد به‌همراه نمونه‌های سرم رقیق نشده با سه تکرار در تیوب‌های مخصوص (۲۵ میکرولیتر) تخلیه شده و ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) *M. lysodeikticus* در بافر مشابه قبلی آماده شده و به‌هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن، تغییر میزان کدورت محلول‌ها در ابتدا و پس از ۴ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سنجش گردید و با مقایسه و معادل‌سازی نمونه با استاندارد، میزان فعالیت در سرم بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت همولیتیک مسیر فرعی کمپلمان

(ACH50): فعالیت‌راه میانبر کمپلمان سرم براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) و به‌کمک روش Waley و North (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان فعالیت راه میانبر کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی (Log-Log Graph) منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه و از برابری زیر استفاده گردید:

$$\text{ACH50(U/ml)} = K \times (\text{فاکتور رقت}) \times 0/5$$

در این رابطه،  $k$  مقداری از سرم است بر حسب میلی‌لیتر که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این تست ۰/۱ می‌باشد چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده بود.

مطالعات شمارش گلبولی و آنالیز بیوشیمیایی خون در مجموعه آزمایشگاه‌های تخصصی ویرومد (رشت، گیلان) و نیز دانشگاه علوم پزشکی یاسوج براساس روش‌های زیر انجام گردید:

#### هموگلوبین: هموگلوبین به‌روش استاندارد سیانومت هموگلوبین

و پس از مخلوط نمودن ۰/۲ میلی‌لیتر خون با ۵ سی‌سی محلول تجارتي درابکین (معرف سیانومت هموگلوبین) و پس از گذشت ۱۰ دقیقه از زمان مخلوط نمودن نمونه برای انجام و تکمیل واکنش‌های شیمیایی، نمونه مخلوط شده به مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه می‌گردید (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰).

#### هماتوکریت: حجم فشرده گلبولی یا PCV به‌همان روش معمول

و متداول برای پستانداران و پرندگان یعنی روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت انجام شده و اندازه‌گیری درصد هماتوکریت با خط‌کش میکروهماتوکریت صورت می‌گرفت (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰).

#### شمارش کلی گلبول‌های قرمز (TRBC): شمارش کلی گلبول‌های

قرمز ماهی به‌روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت برای این کار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده لويس (Lewis) استفاده شده و با استفاده از لام هماسیتومتر و با بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌لیتر مکعب خون محاسبه می‌شد (Thrall, ۲۰۰۴).

#### اندیس‌های گلبولی: اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط

گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از روابط استاندارد موجود محاسبه گردید (Thrall, ۲۰۰۴):

$MCV =$  تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)  $\times 10/$  هماتوکریت (درصد)  
 $MCHC =$  هماتوکریت (درصد)  $\times 10/$  هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)  
 $MCH =$  تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)  $\times 10/$  هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)

#### شمارش کلی گلبول‌های سفید (TWBC): شمارش کلی گلبول‌های

سفید به‌روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول‌های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده لويس صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر تعداد گلبول‌های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش می‌گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از برابری زیر محاسبه گردید (Thrall, ۲۰۰۴):



و با آنالیز واریانس یک طرفه (One – Way ANOVA) انجام شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، یکنواختی واریانس با آماره لیون (Levene) و نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون کروسکال-والیس استفاده گردید.

## نتایج

نتایج مطالعه حاضر از اندازه‌گیری و ثبت شاخص‌های رشد و تغذیه، خون‌شناسی و شمارش گلبولی، ایمنی‌شناسی در تیمارهای مورد مطالعه حاصل شد. نتایج براساس (انحراف معیار  $\pm$  میانگین) ثبت گردیده است.

**بررسی عملکرد رشد:** نتایج حاصل از سنجش شاخص‌های رشد در جدول ۲ آمده است. براساس جدول ذکر شده، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین ماهیان تغذیه شده با پروبیوآنزیم با گروه ماهیان شاهد (تیمار ۱) در شاخص‌های وزن اولیه، نهایی، افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، شاخص کبدی، نسبت و ضریب تبدیل غذایی مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). ضریب کارایی پروتئین ماهیان تیمار ۳ (تغذیه شده با ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم) به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به ماهیان شاهد بیش تر بود. و در مقدار آن در تیمار ۲ با ماهیان شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ).

**اندازه‌گیری کمپلمان‌های C3 و C4:** جهت اندازه‌گیری کمپلمان‌های C3 و C4 به روش کدورت سنجی ایمنی (Immuno Turbidometry) بر مبنای کدورت حاصل از اتصال هر کدام از این کمپلمان‌ها با آنتی‌بادی ضد آن سنجش شده است (Reyes-Becerril و همکاران، ۲۰۰۸). برای کالیبره کردن آن از کیت مخصوص شرکت پارس آزمون استفاده شد. **اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین کل (Ig) و سنجش IgM:** مقدار ایمنوگلوبولین کل سرم باروش Siwicki و همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا سرم با استفاده از ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم به میزان یک دوم رقیق گردید، سپس مقدار پروتئین کل آن با روش رنگ سنجی برادفورد (Kruher، ۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد. بعد از آن با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ درصد، آنتی‌بادی‌های سرم رسوب داده شد و مقدار پروتئین محلول رویی اندازه‌گیری گردید. تفاوت بین مقدار پروتئین کل سرم با مقدار پروتئین مایع رویی پس از ترسیب آنتی‌بادی‌ها، عبارت است از میزان آنتی‌بادی کل سرم که بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان می‌گردد. میزان IgM سرم براساس روش الایزا و کدورت حاصل از اتصال ایمنوگلوبولین با آنتی‌بادی ضد آن و تهیه شده از سرم موش (Aquatic Diagnostics Ltd.) سنجش شده است (Reyes-Becerril و همکاران، ۲۰۰۸).

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ مرتب گردید. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۳ و با آزمون آماری LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) با درصد اطمینان ۹۵

جدول ۲: شاخص‌های رشد و تغذیه تیمارهای مختلف: ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا\*

| شاخص‌های رشد و تغذیه       | تیمارهای آزمایشی             | تیمار ۱ (شاهد)               | تیمار ۲                      | تیمار ۳                      |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| وزن اولیه (گرم)            | ۲۶/۱ $\pm$ ۲/۴ <sup>a</sup>  | ۲۶/۲ $\pm$ ۲/۶ <sup>a</sup>  | ۲۶/۵ $\pm$ ۲/۷ <sup>a</sup>  | ۲۶/۵ $\pm$ ۲/۷ <sup>a</sup>  |
| وزن نهایی (گرم)            | ۷۶ $\pm$ ۷/۸ <sup>a</sup>    | ۷۷/۳ $\pm$ ۸ <sup>a</sup>    | ۷۷/۸ $\pm$ ۵/۱ <sup>a</sup>  | ۷۷/۸ $\pm$ ۵/۱ <sup>a</sup>  |
| افزایش وزن (گرم)           | ۴۹/۸ $\pm$ ۸/۴ <sup>a</sup>  | ۵۱/۳ $\pm$ ۸ <sup>a</sup>    | ۵۱/۲ $\pm$ ۶/۳ <sup>a</sup>  | ۵۱/۲ $\pm$ ۶/۳ <sup>a</sup>  |
| افزایش وزن (درصد)          | ۱۹۰ $\pm$ ۴۰ <sup>a</sup>    | ۲۰۰ $\pm$ ۴۲ <sup>a</sup>    | ۱۹۶ $\pm$ ۳۷ <sup>a</sup>    | ۱۹۶ $\pm$ ۳۷ <sup>a</sup>    |
| ضریب رشد ویژه (درصد)       | ۱/۷۷ $\pm$ ۰/۲ <sup>a</sup>  | ۱/۸ $\pm$ ۰/۳ <sup>a</sup>   | ۱/۸ $\pm$ ۰/۳ <sup>a</sup>   | ۱/۸ $\pm$ ۰/۳ <sup>a</sup>   |
| افزایش وزن روزانه (گرم)    | ۰/۸ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>a</sup>  | ۰/۸۶ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>  | ۰/۸۶ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>a</sup> | ۰/۸۶ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>a</sup> |
| شاخص کبدی                  | ۱/۳۳ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup> | ۱/۲۶ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>a</sup> | ۱/۳ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>   | ۱/۳ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>   |
| نسبت تبدیل غذایی           | ۱/۱ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>   | ۱/۱۵ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>a</sup> | ۰/۹۵ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>  | ۰/۹۵ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>  |
| بازده تبدیل غذایی          | ۰/۹۲ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup> | ۰/۹ $\pm$ ۰/۲ <sup>a</sup>   | ۱/۱ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>  | ۱/۱ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>a</sup>  |
| ضریب کارایی پروتئین (درصد) | ۲/۵ $\pm$ ۰/۴ <sup>a</sup>   | ۲/۵ $\pm$ ۰/۴ <sup>ab</sup>  | ۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>     | ۳ $\pm$ ۰/۴ <sup>b</sup>     |
| کل غذای مصرف شده (گرم)     | ۵۵/۲ $\pm$ ۴/۲ <sup>a</sup>  | ۵۷/۶ $\pm$ ۱۵/۳ <sup>a</sup> | ۴۹ $\pm$ ۲/۴ <sup>a</sup>    | ۴۹ $\pm$ ۲/۴ <sup>a</sup>    |

\*وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.



**شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی: براساس جدول**

۳ تیمارهای مختلف از نظر شاخص‌های هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول قرمز، حجم متوسط گلبولی (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، فاقد تفاوت معنی‌دار بودند ( $P > 0.05$ ).

میانگین مربوط به گلبول‌های سفید و نیز درصد گلبول‌های نوتروفیل در تیمار ۳ با اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیش‌تر از گروه ماهیان شاهد (۱ تیمار) بوده و بین میانگین این شاخص‌ها در تیمار ۱ و ۲ و نیز تیمارهای ۲ و ۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

**جدول ۳: شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی تیمارهای مختلف، ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا\***

| تیمار ۳  | تیمار ۲  | تیمار ۱ (شاهد)   | تیمارهای آزمایشی | شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی                        |
|--|--|--|------------------|--|
| ۸/۳±۰/۶ <sup>a</sup>                                 | ۸/۵±۰/۷ <sup>a</sup>                                   | ۷/۹±۰/۶ <sup>a</sup>                                   |                  | هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)                              |
| ۴۳±۳/۶ <sup>a</sup>                                  | ۴۵/۳±۴/۹ <sup>a</sup>                                  | ۴۱/۳±۳/۲ <sup>a</sup>                                  |                  | هماتوکریت (درصد)   |
| ۱/۴۴×۱۰ <sup>۶</sup> ±۱×۱۰ <sup>۵</sup> <sup>a</sup> | ۱/۵×۱۰ <sup>۶</sup> ±۱/۸×۱۰ <sup>۵</sup> <sup>a</sup>  | ۱/۳۴×۱۰ <sup>۶</sup> ±۱/۴×۱۰ <sup>۵</sup> <sup>a</sup> |                  | گلبول قرمز (تعداد در میلی‌مترمکعب)                       |
| ۲۹۷/۳±۵/۱ <sup>a</sup>                               | ۳۰۴±۴/۶ <sup>a</sup>                                   | ۳۰۸/۷±۷/۶ <sup>a</sup>                                 |                  | حجم متوسط گلبولی (MCV) (فمتولیت)                         |
| ۵۷/۷±۰/۶ <sup>a</sup>                                | ۵۷±۱/۷ <sup>a</sup>                                    | ۵۸/۷±۲/۱ <sup>a</sup>                                  |                  | متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) (پیکوگرم)                   |
| ۱۹/۴±۰/۶ <sup>a</sup>                                | ۱۸/۷±۰/۶ <sup>a</sup>                                  | ۱۹±۰ <sup>a</sup>                                      |                  | غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) (گرم در دسی‌لیتر) |
| ۱/۵×۱۰ <sup>۴</sup> ±۳×۱۰ <sup>۳</sup> <sup>b</sup>  | ۱/۱×۱۰ <sup>۴</sup> ±۱/۴×۱۰ <sup>۳</sup> <sup>ab</sup> | ۹/۶×۱۰ <sup>۳</sup> ±۲/۷×۱۰ <sup>۳</sup> <sup>a</sup>  |                  | گلبول سفید (تعداد در میلی‌مترمکعب)                       |
| ۳۷/۳±۲/۱ <sup>b</sup>                                | ۳۳/۶۷±۰/۷ <sup>ab</sup>                                | ۳۳/۳±۲/۵ <sup>a</sup>                                  |                  | نوتروفیل (درصد)  |
| ۵۷/۳±۲/۵ <sup>a</sup>                                | ۶۱/۳±۱/۵ <sup>a</sup>                                  | ۶۲/۷±۴/۲ <sup>a</sup>                                  |                  | لنفوسیت (درصد)   |
| ۵±۰ <sup>a</sup>                                     | ۴/۳±۰/۶ <sup>a</sup>                                   | ۴±۱/۷ <sup>a</sup>                                     |                  | مونوسیت (درصد)   |
| ۰/۳±۰/۶ <sup>a</sup>                                 | ۰/۶۷±۰/۶ <sup>a</sup>                                  | ۰/۳±۰/۶ <sup>a</sup>                                   |                  | ائوزینوفیل (درصد)  |

\* وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

شاخص‌های فعالیت راه میانبر کمپلمان و ایمنوگلوبولین (IgM) بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ( $P > 0.05$ ). سنجش میزان لایزوزیم سرم نشان داد که میزان آن در ماهیان تیمار ۳ به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با تیمار شاهد بیش‌تر بود. هم‌چنین میزان گلبولین کل در دو تیمار ذکر شده دارای تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بودند (جدول ۴).

**شاخص‌های ایمنی‌شناسی: نتایج ایمنی‌شناسی براساس آنالیز**

بیوشیمیایی سرم در تیمارهای مختلف حاصل شده است (جدول ۴). براساس جدول ۴ کمپلمان‌های C3 و C4 با اختلاف معنی‌داری در سرم ماهیان تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بوده ( $P < 0.05$ ) و اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۲ و یک مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). مقایسه میزان

**جدول ۴: آنالیز بیوشیمیایی نمونه سرم در تیمارهای مختلف، ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا\***

| تیمار ۳                | تیمار ۲                 | تیمار ۱ (شاهد)          | تیمارهای آزمایشی | شاخص‌های ایمنی‌شناسی سرم                   |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|--|
| ۵۱/۳±۱۶/۵ <sup>b</sup> | ۳۴/۷±۷/۵ <sup>ab</sup>  | ۲۵/۳±۵/۸ <sup>a</sup>   |                  | C3 (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)                  |
| ۲۲/۷±۳/۲ <sup>b</sup>  | ۱۸/۳±۴/۷ <sup>ab</sup>  | ۱۳±۴/۴ <sup>a</sup>     |                  | C4 (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)                  |
| ۷۳/۷±۲۲ <sup>a</sup>   | ۵۷/۳±۷/۳ <sup>a</sup>   | ۴۷/۳±۱۱ <sup>a</sup>    |                  | IgM (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)                 |
| ۵۴/۳±۸/۱ <sup>b</sup>  | ۴۷/۷±۷/۸ <sup>ab</sup>  | ۳۱/۷±۸/۹ <sup>a</sup>   |                  | لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر)            |
| ۱۵۳±۲۹/۵ <sup>a</sup>  | ۱۳۹/۷±۲۶/۷ <sup>a</sup> | ۱۲۲/۳±۱۲/۹ <sup>a</sup> |                  | فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (یو در میلی‌لیتر) |
| ۲۱/۳±۳/۱ <sup>b</sup>  | ۲۰/۳±۱/۵ <sup>ab</sup>  | ۱۹/۳±۳/۲ <sup>a</sup>   |                  | ایمنوگلوبولین کل (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)   |

\* وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.



## بحث

**تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد:** پروبیوآنزیم مورد استفاده در این مطالعه، شامل پروبیوتک‌ها و ترکیبات آنزیمی بود. بخش آنزیمی زمینه فعالیت پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان محرک سیستم ایمنی ماهی فراهم می‌سازد (Pettersson, 2005). تحقیقات متعددی در خصوص افزودن آنزیم‌های پانکراس نظیر پروتئازها به غذای ماهیان انجام شده و افزایش رشد، بازدهی غذا و افزایش قابلیت هضم پروتئین از منابع گیاهی را گزارش نموده اند (Lin و همکاران، 2007؛ Drew و همکاران، 2005). در سال‌های اخیر، استفاده از آنزیم‌های موثر در هضم پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در تغذیه آبزیان افزایش یافته است. این آنزیم‌ها شامل گلوکاناز، پنتوزاناز، سلولاز و گزیلاناز بوده و با هیدولیز پلی ساکاریدها، فراورده‌هایی جهت استفاده باکتری‌ها و نیز ماهیان تولید می‌کنند (Sinha و همکاران، 2011). افزودن این مکمل‌های آنزیمی باعث بهبود جذب پروتئین‌ها و رشد در ماهیان می‌گردند (Jiang و همکاران، 2014؛ Ai و همکاران، 2007). گزیلاناز همی سلولز رابه‌عنوان ترکیب اصلی دیواره سلول‌های گیاهی تجزیه‌نموده (Ganguly و همکاران، 2013) و در طیور باعث ورود آنزیم‌های دستگاه گوارش به سلول‌های بافت‌های گیاهی در منابع غذایی و تسهیل هضم نشاسته و پروتئین‌ها می‌گردد (Sinha و همکاران، 2011). مطالعات انجام شده مخمرهای تولیدکننده آنزیم‌های گروه گزیلاناز را از دستگاه گوارش ماهیان گیاه‌خوار از جمله کپورهندی و تیلاپیای نیل جدا نموده‌اند. بنابراین، اغلب پژوهش‌ها باید بر شناسایی نقش این آنزیم‌ها در هضم و جذب پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در این گروه از ماهیان متمرکز گردد (Bogevik, 2015). pH پایین و آنزیم‌های پروتئاز در دستگاه گوارش سبب کاهش فعالیت مکمل‌های آنزیمی به غذا می‌باشد. مواد همراه آنزیم‌های افزوده شده به غذا جهت جلوگیری از غیرفعال‌سازی این آنزیم‌ها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Bogevik, 2015). استفاده از گزیلاناز در تغذیه ماهی سی‌بس دریایی باعث ارتقاء رشد و بهره‌برداری از پروتئین غذا گردید (Ai و همکاران، 2007) در حالی‌که افزودن این مکمل آنزیمی به غذای حاوی پودر سویا و آفتابگردان و یا کلزا در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (70-110 گرم) فاقد تاثیر معنی‌داری بر رشد و کارایی جذب پروتئین بود (Dalsgaard و همکاران، 2012).

ماهیان دارای معده مشخص، نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای pH پایین در معده بوده و در حالت عادی در محدوده 2-3 می‌باشد و این ویژگی با توانایی این ماهی جهت هضم پروتئین‌ها به‌ویژه از منابع حیوانی منطبق می‌باشد و آنزیم پپسین جهت تجزیه پروتئین‌ها در چنین شرایط اسیدی فعال می‌گردد. درحالی‌که، ماهیان گیاه‌خوار

اغلب فاقد معده مشخص و دارای pH بالاتری در سیستم گوارش می‌باشند (Freitag, 2007). براساس این یافته‌ها، عبور مکمل‌های آنزیمی از شرایط اسیدی دستگاه گوارش در ماهیان گیاه‌خوار بدون تغییر ماهیت ممکن می‌باشد. با این وجود، مکمل آنزیمی در تغذیه ماهیان سردابی، ترکیبات پروتئینی بوده و در شرایط اسیدی دستگاه گوارش می‌تواند توسط پروتئازها غیرفعال گردند. بنابراین، می‌توان گفت زمینه فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلا بیش‌تر از سایر آنزیم‌ها بوده و منطبق با نتیجه مربوط به افزایش ضریب کارایی پروتئین در تیمار 3 نسبت به سایر تیمارها می‌باشد و عدم تاثیر معنی‌دار ترکیب پروبیوآنزیم مورد استفاده بر رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در این مطالعه می‌تواند ناشی از عدم وجود شرایط محیطی فعالیت آنزیم‌های افزوده شده باشد. از طرف دیگر، نوع مواد غذایی می‌تواند در تغییر pH دستگاه گوارش موثر باشد. استفاده از پروتئین حیوانی موجود در پودر ماهی 15 برابر بیش‌تر از غلات در کاهش pH دستگاه گوارش موثر می‌باشد (Freitag, 2007). بنابراین، علاوه بر نوع گونه ماهی مورد آزمایش، نتایج متفاوت در بررسی تاثیر مکمل‌های آنزیمی بر شاخص‌های رشد و تغذیه می‌تواند ناشی از تفاوت در اجزا و منشاء مواد غذایی باشد. درحالی‌که در پژوهش حاضر از غذای معمولی بدون توجه به استفاده غالب از منابع حیوانی یا گیاهی استفاده شده است. تاثیر مثبت ترکیب پروبیوآنزیم بر ارتقاء سیستم ایمنی در مطالعه نیک‌پیران (1389) با بررسی تاثیر استفاده از ترکیب پروبیوآنزیم در جیره غذایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و تیتیر حاصل از واکسن گامبرو مشاهده می‌شود. براساس نتایج تحقیق وی، پروبیوآنزیم باعث کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی و بهبود معنی‌دار وزن نهایی بدن در مقایسه با گروه شاهد گردید. گروه‌های شاهد و پروبیوآنزیم فاقد اختلاف معنی‌داری از نظر تیتیر آنتی‌بادی بر علیه گامبرو بودند. ولی با این وجود، تیتیر آنتی‌بادی بر علیه گامبرو در گروه پروبیوآنزیم نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. هم‌چنین تحقیق نجفی و همکاران (1389) در بررسی تاثیر پروبیوآنزیم با دوز 0/05 درصد را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی حاکی از افزایش وزن و کاهش ضریب تبدیل غذایی در حد معنی‌دار در جوجه‌های دریافت‌کننده این مکمل نسبت به گروه شاهد بودند.

مطالعات دیگری تاثیر پروبیوآنزیم را بر پارامترهای رشد و تغذیه مثبت‌ارزیابی نمودند. حسین‌پور (1393) عملکرد رشد و بقای لارو میگوئی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با استفاده از سطوح مختلف پروبیوآنزیم مورد استفاده در پژوهش حاضر، را در جیره غذایی بررسی نمودند. طی دوره آزمایش، تاثیر پروبیوآنزیم با هدف بررسی تاثیر استفاده هم‌زمان باکتری‌های پروبیوتیکی با آنزیم‌های هضمی بر فاکتورهای رشد و بقاء، ترکیب لاشه و مقاومت در برابر استرس شوری در پست لارو میگوئی



و یا غلظت بالاتر جهت بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه معنی‌دار شود (Azad و Ridha، ۲۰۱۲؛ Shen و همکاران، ۲۰۱۰).

#### تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های خون‌شناسی: در مورد تاثیر

محرک‌های ایمنی بر شاخص‌های خون‌شناسی تحقیقات متعددی صورت گرفته است و نتایج متفاوتی از تاثیر این مواد گزارش گردیده است. در برخی مطالعات، تاثیر این مواد بر شاخص‌های خون‌شناسی گزارش شده است و یافته‌های حاصل از پژوهش‌های دیگر بر بی‌اثر بودن محرک‌های ایمنی بر این شاخص‌ها استوار است (Sakai، ۱۹۹۹). براساس پژوهش حاضر، پروبیوآنزیم تاثیر معنی‌داری بر میزان هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC و تعدادکلی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشته است. نتیجه این تحقیق با مطالعه تاثیر محرک ایمنی اسانس گیاه اکیناسه (ایمنوفن) بر فاکتورهای خون‌شناسی مربوط به گلبول‌های قرمز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (اسلامی، ۱۳۹۰) و تاثیر استفاده از بتاگلوکان تجاری (ماکروگارد) به میزان ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم غذا بر میزان این شاخص‌های خون‌شناسی و تعدادکلی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۲۸ گرم (پورمظفر و همکاران، ۱۳۹۳) منطبق می‌باشد. با این وجود، افزایشی در تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای استفاده از پروبیوآنزیم نسبت گروه ماهیان شاهد وجود دارد. این فرضیه مطرح است که مواد محرک ایمنی موجب افزایش متابولیسم در ماهی شده در نتیجه تعداد و ظرفیت حمل اکسیژن در گویچه‌های قرمز افزایش می‌یابد (Irianto و Austin، ۲۰۰۲). البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد به‌ویژه ماهی برخلاف حیوانات خونگرم تا حد زیادی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از جمله استرس، دما، فصل و تغذیه قرار گرفته و تابلوی خوبی برای بررسی وضعیت سلامت یا ایمنی ماهی به‌شمار نمی‌رود (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). تاثیر پروبیوآنزیم مورد استفاده بر افزایش تعداد گلبول‌های سفید و در شمارش افتراقی، تعداد نوتروفیل‌ها در تیمارها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. هم‌چنین، در پژوهش‌های انجام شده، تجویز خوراکی ماکروگارد موجب افزایش رشد و بهبود پاسخ‌های ایمنی ماهی از طریق تکثیر گویچه‌های سفید خون به‌خصوص جمعیت نوتروفیلی قزل‌آلای رنگین‌کمان (پورمظفر و همکاران، ۱۳۹۳) و ماده محرک ایمنی ایمنوفن باوجود عدم تاثیر در تغییر تعداد گلبول‌های قرمز منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید گردید (اسلامی، ۱۳۹۰). تاثیر مواد محرک ایمنی بر اجتماع گلبول‌های سفید منطقی به‌نظر می‌رسد. زیرا گلبول‌های سفید نقش قابل توجهی در ترشح فاکتورهای هومورال موثر در سیستم دفاع ذاتی آبزیان ایفا می‌کنند و افزایش این فاکتورهای هومورال تحت تاثیر افزایش تعداد لکوسیت‌های خونی بوده است. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در عفونت‌های طبیعی و

وانامی مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایش ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا و تیمار شاهد بدون استفاده از این مکمل در جیره میگو بود. براساس نتایج این تحقیق، تیمار ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا دارای بیش‌ترین میانگین رشد و بقا و مقاومت در مقابل شوری و بهترین عملکرد در ترکیب لاشه را نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد داشت. هم‌چنین، نتیجه مطالعه تاثیر مکمل پروبیوآنزیم بر فعالیت آنزیم‌های هضمی میگوی وانامی حاکی از تاثیر مثبت و معنی‌دار غلظت معینی از این ترکیب بر فعالیت‌های آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتاز در میگو می‌باشد (حسین‌پور و همکاران، ۱۳۹۴). در بررسی سطوح مختلف پروبیوآنزیم را بر درصد بازماندگی و برخی شاخص‌های رشد در بچه ماهی گورامی (*Trichogaster trichopterus*) نامداریان و ضیائی‌نژاد (۱۳۹۲) گروه ماهیان تغذیه شده شامل یک و دو درصد جیره حاوی پروبیوآنزیم با گروه شاهد مقایسه شدند. بالاترین درصد بازماندگی و شاخص‌های رشد مانند ضریب رشد ویژه و وزن تر و طول کل در تیمار با میزان یک درصد جیره از مکمل پروبیوآنزیم نسبت به تیمارهای دو درصد مشاهده گردید. با این وجود هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش و نیز گروه شاهد مشاهده نشد.

براساس مطالعات انجام شده، تاثیر مثبت پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه در طیور، ماهی گورامی و میگوی سفید غربی می‌تواند تا حدی وابسته به قابلیت دستگاه گوارش آن‌ها در هضم پروتئین‌های گیاهی باشد. با توجه به عادت غذایی این گونه‌ها و رژیم غذایی گیاه‌خواری در طیور و همه‌چیزخواری در ماهی گورامی (Webb و همکاران، ۲۰۰۷) زمینه فعالیت آنزیم‌های موجود در ترکیب پروبیوآنزیم در دستگاه گوارش آن‌ها نسبت به ماهیان گوشت‌خوار از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود دارد. چنین قابلیت‌هایی نیز در میگوی سفید غربی می‌تواند به‌دلیل قابلیت مطلوب تغذیه از منابع پروتئین گیاهی در این گونه باشد (Davis و همکاران، ۲۰۰۴). بالا بودن سهم پروتئین گیاهی در جیره میگوی سفید غربی نسبت به سایر میگوهای پرورشی و به‌طورکلی پائین بودن میزان پروتئین مورد نیاز آن نقطه قوت توسعه و پرورش این گونه است (Thomas و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طورکلی متغیرهای متعددی بر تاثیر پروبیوآنزیم در گونه‌های مختلف وجود دارد. به‌طوری‌که حتی در طیور، در مطالعه تاثیر این ماده بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) توسط امیدزاده و همکاران (۱۳۹۳) بین اثر انفرادی و اثر متقابل پودر سماق (*Rhus coriaria*) و پروبیوآنزیم در تاثیر بر صفات مورد بررسی، خوراک مصرفی روزانه، ضریب تبدیل غذایی، تری‌گلیسرید و کلسترول خون نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. براساس نتایج، تاثیر مکمل پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد ممکن است به استفاده از مکمل در دوره طولانی‌تر





تجربی و در مواقع استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی متعدد گزارش شده است (Marian, ۲۰۰۴).

عدم تاثیر تغذیه جوجه‌های گوشتی با پروبیوآنزیم بر عملکرد رشد و کاهش درصد هتروفیل‌های خونی و افزایش لنفوسیت‌ها در خون آن‌ها (نوبخت و همکاران، ۱۳۹۱) می‌تواند به دلیل قابلیت ایمنی‌زایی این ترکیب باشد. هتروفیل‌ها، سلول‌های فاگوسیت هستند که برای مقابله با عوامل عفونی نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها و نیز ذرات خارجی شکل گرفته‌اند و به‌میزان زیادی در محل‌های آسیب دیده در اثر تولید مواد شیمیایی جاذب، حضور می‌یابند. عمده‌ترین عمل هتروفیل‌ها به دام انداختن و از بین بردن ذرات بیگانه به‌وسیله فاگوسیتوز می‌باشد و افزایش تعداد آن‌ها شاخص مهمی جهت مشخص نمودن وجود عوامل میکروبی و بیماری‌زا در بدن می‌باشد. در حال عادی و عدم وجود بیماری و حملات میکروبی، لنفوسیت‌ها اکثریت گلبول‌های سفید خون طیور را تشکیل می‌دهند. نسبت هتروفیل‌ها به لنفوسیت شاخص مهمی در ارزیابی سطح ایمنی بدن می‌باشد و هرچقدر این نسبت کم‌تر باشد، به‌همین مقدار نیز سطح ایمنی بدن بالا بوده و احتمال مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا بهبود می‌یابد (Sturkie, ۱۹۹۵).

**تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های ایمنی:** مکمل‌های غذایی محرک ایمنی، طیف وسیعی از مواد غیرزنده از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و عصاره‌های گیاهی و مواد زنده شامل باکتری‌های پروبیوتیک را دربر می‌گیرد (Amar و همکاران، ۲۰۰۴؛ Verlhac Trichet و همکاران، ۲۰۱۰؛ Martinez Alvarez و همکاران، ۲۰۰۵). ارزیابی تاثیر این مواد از طریق تغذیه از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. پژوهشی توسط Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر بررسی اثرات مکمل‌های غذایی گالاکتولیگوساکارید (GOS)، باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و ترکیب *P. acidilactici* و GOS در پاسخ ایمنی ذاتی، قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد که براساس نتایج آن، بالاترین پاسخ ایمنی در تغذیه ماهی با سین‌بیوتیک مشاهده شد. نتایج بررسی تاثیر پروبیوتیک تغذیه‌ای *B. subtilis* بر پارامترهای رشد و پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حاکی از عدم تاثیر معنی‌دار این ترکیب بر پارامترهای ضریب رشد ویژه بوده و وزن نهایی ماهیان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (Mahmoudzadeh و همکاران، ۲۰۱۶). براساس نتایج بررسی تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و ویتامین C بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (توکمه‌چی و همکاران، ۱۳۹۱) و تاثیر *B. subtilis* و ویتامین C بر رشد ماهی روهو (Nayak, ۲۰۰۷)، این باکتری‌های پروبیوتیک، تنها همراه با ویتامین بر رشد و شاخص‌های ایمنی شامل فعالیت لیزوزیم سرم، راه میانبر کمپلمان و میزان آنتی‌بادی کل پلاسما موثر بودند.

لیزوزیم، یک آنزیم کاتیونی با فعالیت ضد میکروبی، باعث تجزیه ترکیبات پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت شده و نیز از طریق اتصال با کمپلمان‌ها سبب تخریب دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌گردند (Balcazer و همکاران، ۲۰۰۷). لیزوزیم باعث افزایش فعالیت بیگانه‌خواری می‌گردد (Sakai, ۱۹۹۹). افزایش فعالیت لیزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Swain و همکاران، ۲۰۰۶). براساس مطالعات انجام شده با فعال شدن سیستم ایمنی، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم افزایش می‌یابد (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج مطالعات اخیر حاکی از افزایش معنی‌دار میزان لیزوزیم سرم در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوآنزیم نسبت به تیمار شاهد می‌باشد. این مشاهدات هم‌سو با یافته پژوهش Mahmoudzadeh و همکاران (۲۰۱۶) بوده، که، میزان لیزوزیم سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۱ گرم پروبیوتیک در غذا بیش‌ترین مقدار را داشته و با افزایش میزان این مکمل (۵ و ۱۰ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا) تغییری در میزان لیزوزیم صورت نگرفت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت پروبیوآنزیم مورد استفاده در این پژوهش از طریق افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، می‌تواند سبب تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد. هم‌چنین Liu و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تاثیر تغذیه ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) با *B. subtilis* افزایش میزان لیزوزیم در تیمارها را در یک وضعیت وابسته به دوز این باکتری را در غذا گزارش نمودند. در مقابل برخی گزارشات مبنی بر عدم تاثیر بر میزان لیزوزیم به‌روش افزودن افزودن این پروبیوتیک به آب را در ماهی تیلپیا گزارش نمودند (Zhou و همکاران، ۲۰۱۰).

مسیر آلترناتیو (Alternative pathway) کمپلمان، بدون نیاز به تشکیل کمپلکس با حضور پادتن، به‌طور مستقیم به‌وسیله لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی فعال شده و باعث تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود (Balcazer و همکاران، ۲۰۰۷). پروبیوتیک‌ها به‌طور طبیعی فعالیت کمپلمان را در ماهیان تقویت نموده و گزارشات متعددی از استفاده از پروبیوتیک‌ها در غذا و آب جهت فعال‌سازی سیستم کمپلمان وجود دارد (Nayak, ۲۰۱۰). نتایج مطالعه اخیر افزایشی را در فعالیت راه میانبر کمپلمان نشان داد. با این وجود، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوآنزیم با تیمار شاهد مشاهده نگردید. یافته‌های این پژوهش با نتایج آزمایش استفاده از پروبیوتیک *B. subtilis* منطبق بود (Mahmoudzadeh و همکاران، ۲۰۱۶). این نتایج می‌تواند ناشی از عدم وابستگی مسیر آلترناتیو به آنتی‌بادی بوده، با این حال، متغیرهای متعددی نظیر دوز پروبیوآنزیم و دوره آزمایش می‌تواند بر فعالیت کمپلمان موثر باشد (Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۲).



## منابع

۱. اسلامی‌فارسانی، ا.، ۱۳۹۰. بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر اندیس‌های رشد و برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اهواز. ۷۵ صفحه.
  ۲. امیدوی‌زاده، م.؛ ولی‌پور، ن. و پوررضا، ج.، ۱۳۹۳. اثر پودر سماق و پروبیوآنزیم بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی. نشریه علوم دامی (پژوهش و سازندگی). دوره ۱۰۴، شماره ۳، صفحات ۱۸۳ تا ۱۹۴.
  ۳. پورمظفر، س.؛ نفیسی‌بهبادی، م.؛ مهاجری، ژ.؛ محمدی، م. و سلیمی‌بجستانی، م. ر.، ۱۳۹۳. مطالعه اثر ماکروگارد بر پارامترهای رشد، خونی و پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مواجه یافته با باکتری استرپتوکوکوس اینایی (*Streptococcus imiae*). مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۷ تا ۳۶.
  ۴. توکمه‌چی، ا.؛ شمسی، ح.؛ مشکینی، س.؛ دلشاد، ر. و قاسمی‌مغانجویی، ا.، ۱۳۹۱. بهبود شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده توام از پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و ویتامین C. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱، شماره ۳، صفحات ۱۳ تا ۲۲.
  ۵. حسین‌پور، م.، ۱۳۹۳. ارزیابی عملکرد رشد و بقای لارو میگوی وانامی با استفاده از سطوح مختلف پروبیوآنزیم در جیره غذایی (*Litopenaeus vannamei*). پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۴۱ صفحه.
  ۶. حسین‌پور، م.؛ جعفری، و.؛ زنده‌بودی، ع. و حاجی‌مرادلو، ع.، ۱۳۹۴. تأثیر پروبیوآنزیم جیره بر فعالیت آنزیم‌های هضمی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*). فصلنامه علوم و فنون شیلات. سال ۴، شماره ۱، صفحات ۳۳ تا ۴۱.
  ۷. رحمتی‌اندانی، ح.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ع.، ۱۳۸۹. مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با آنروموناتس هیدروفیلو و یرسینیاروکری با استفاده از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. سال ۷، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۷.
  ۸. علیشاهی، م.، ۱۳۸۸. مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان. تالیف سواپن، پی، ساهو، پی. کی، آیپان، اس. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز. ۴۹۹ صفحه.
  ۹. نامداریان‌راد، ا. و ضیائی‌نژاد، س.، ۱۳۹۲. اثرات سطوح مختلف پروبیوآنزیم بر درصد بازماندگی و برخی شاخص‌های رشد در بچه ماهی گورامی (*Trichogaster trichopterus*). اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار. ۱۰ تا ۱۲ بهمن، تهران.
- افزایش فعالیت سیستم کمپلمان نشان‌دهنده فعال شدن سیستم ایمنی می‌باشد (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۵). در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار کمپلمان‌های C3 و C4 در تیمار ۳ نسبت به تیمار ۱ مشاهده می‌گردد. به طوری که روند تغییر این ترکیبات هم‌سو با فعالیت لیزوزیم سرم بوده است. هم‌چنین میزان ایمونوگلوبولین کل در تیمار ۳ نسبت به تیمار ۱ با اختلاف معنی‌داری افزایش یافته است. این نتیجه در توافق با مطالعه Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) مبنی بر افزایش سطح آنتی‌بادی‌های سرم با تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پروبیوتیک *L. rhamnosus* می‌باشد. با این وجود میزان IgM به‌عنوان یک شاخص ایمنی اختصاصی تحت تأثیر پروبیوآنزیم فاقد تغییر معنی‌دار بوده است. میزان توصیه شده مکمل پروبیوآنزیم توسط شرکت سازنده XVET GmbH (آلمان) در دام و آبزیان در محدوده ۰/۳ - ۰/۵ گرم در کیلوگرم غذا بوده است. براساس نتایج این تحقیق، تأثیر ناچیز دوز کم در محیط‌های آبی به‌واسطه آب‌شویی (leaching) مکمل از غذا تشدید می‌شود. آنزیم‌های موجود در ترکیب پروبیوآنزیم به‌منظور هضم پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در منابع پروتئین گیاهی به غذا اضافه شده است. بنابراین استفاده از مکمل‌های آنزیمی گروه گزیلاناز و سلولاز در گونه‌های گیاه‌خوار ضمن داشتن شرایط اسیدی متعادل در دستگاه گوارش منطقی به‌نظر می‌رسد. براساس نتایج پژوهش حاضر، این آنزیم‌ها در تغذیه ماهیان گوشت‌خوار نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان، با شرایط اسیدی قوی در دستگاه گوارش، عملکرد مطلوبی نداشته و نمی‌توانند تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه داشته باشند. به‌علاوه، بخش باکتریایی ترکیب پروبیوآنزیم، اجتماعی از باکتری‌های پروبیوتیک بوده که در صورت استفاده از ترکیب پروبیوآنزیم با دوز و دوره زمانی مناسب، نقش قابل توجهی در ارتقاء سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایفا نموده و قابلیت ماهی را در مواجهه با عوامل بیماری‌زا و جلوگیری از بروز عفونت و تلفات افزایش می‌دهد.
- بررسی تأثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه در گونه‌های ماهیان گیاه‌خوار و مقایسه با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ارزیابی میزان مقاومت ماهیان تیمار شده گونه‌های مختلف با پروبیوآنزیم در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا از طریق انجام تست مقاومت باکتریایی پیشنهاد می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به‌خاطر پشتیبانی مالی از این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.



۱۰. نجفی، ر.؛ دانشیار، م.؛ شیردل، ص. و حسینی، ح.، ۱۳۸۹. مطالعه تاثیر پروبیوتانزیم و گریندازیم بر عملکرد جوجه‌های گوشتی. خلاصه مقالات چهارمین کنگره علوم دامی کشور. صفحات ۱۰۸۶ تا ۱۰۸۹.
۱۱. نوبخت، ع.؛ بیگ‌بابایی، ر. و تقی‌زاده، ا.، ۱۳۹۱. اثرات افزودنی پروبیوتانزیم بر عملکرد و متابولیت‌های خون جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف گندم و جو. نشریه پژوهش‌های علوم دامی. سال ۲۲، شماره ۳، صفحات ۱ تا ۱۴.
۱۲. نیک‌پیران، ح.، ۱۳۸۹. بررسی تاثیر استفاده از ترکیب توربوتوکس و پروبیوتانزیم در جیره غذایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و تیتیر حاصل از واکسن گامبرو. گزارش نهایی طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی. واحد تبریز. ۳۰ صفحه.
۱۳. یزدی‌صمدی، ب.؛ رضایی، ع. و ولی‌زاده، م.، ۱۳۷۶. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی، انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴۴ صفحه.
۱۴. Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, W.; Xu, W.; Tan, B.; Zhang, C. and Li, H., 2007. Effects of exogenous enzyme (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology. Vol. 147, pp: 502-208.
۱۵. Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immunology. Vol. 16, pp: 527-537.
۱۶. Balcazer, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuola, I.; Vendrell, D.; Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2007. Enhancement of the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunology and Medical Microbiology (Federation of European Microbiological Societies). Vol. 51, pp: 185-193.
۱۷. Bedford, M.R. and Partridge, G., 2010. Enzymes in farm animal nutrition (2nd edition). CAB international publication, Bodmin, UK.
۱۸. Bogevik, A.S., 2015. Xylanase supplementation in fish feed. Nofima, Norway. 10 p.
۱۹. Cerezuola, R.; Guardiola, F.A.; Gonzalez, P.; Meseguer, J. And Esteban, A., 2012. Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 342-349.
۲۰. Clerton, P.; Troutaud, D.; Verlhac, V.; Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte function: effect on gut and head kidney leucocyte. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 11, pp: 1-13.
۲۱. Dalsgaard, J.; Verlhac, V.; Hjermitsev, N.H.; Ekmann, K.S.; Fischer, M.; Klausen, M. and Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal Feed Science Technology. Vol. 171, pp: 181-191.
۲۲. Davis, D.A.; Samocha, T.N.; Bullis, R.A.; Pantnaik, S.; Browdy, C.L.; Stokes A.D. and Atwood H.L., 2004. Practical diet for (*Litopenaeus vannamei*). Working towards organic and/or all plant production diet. 16-19 November, Hermosillo, Sonora, Mexico. pp: 202-213.
۲۳. Drew, M.D.; Racz, V.J.; Gauthier, R. and Thiessen, D.L., 2005. Effect of adding protease to coextruded flax: pea or canola: pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Feed Science Technology. Vol. 119, pp: 117-128.
۲۴. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins. pp: 1120-1124.
۲۵. Freitag, M., 2007. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Lu" cksta" dt C, editor. Acidifiers in Animal Nutrition – A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance. 1st ed.: Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp: 1-11.
۲۶. Ganguly, S.; Dora, K.C.; Sarkar, S. and Chowdhury, S., 2013. Supplementation of probiotics in fish feed: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Vol. 23, pp: 195-199.
۲۷. Grinde, B.; Lie, O.; Poppe, T. and Salte, R., 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture. Vol. 68, pp: 299-304.
۲۸. Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Mojazi Amiri, B.; Rostami, H.K. and Merrifield, D.L., 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Nutrition. Vol. 17, pp: 498-504.
۲۹. Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture (Review). Journal of Fish. Diseases. Vol. 25, pp: 633-642.
۳۰. Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish. pp: 73-114.
۳۱. Jiang, T.T.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, W.D.; Jiang, J.; LI, S.H.; Tang, L.; Kuang, S.Y. and Zhou, X.Q., 2014. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Nutrition. Vol. 20, pp: 632-645.
۳۲. Kruger, N.J., 1996. The Bradford method for protein quantization. In: Walker, J. M. Ed., the protein protocols Handbook. Vol. 1, Human Press, Totowa, USA. pp: 11-15.
۳۳. Kubulay, A. and Ulukoy, G., 2002. The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology. Vol. 26, pp: 249-254.
۳۴. Lie, O.; Evensen, O.; Sorensen, A. and Froysadal, E., 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. Disease of Aquatic Organism. Vol. 6, pp: 1-5.
۳۵. Lin, S.; Mai, K. and Tan, B., 2007. Effect of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquacul Rese. Vol. 38, pp: 1645-1653.
۳۶. Liu, B.; Xu, L.; Ge, X.; Xie, J.; Xu, P.; Zhou, Q.; Pan, L. and Zhang, Y., 2013. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and shellfish immuno. Vol. 34, pp: 1395-1403.
۳۷. Liu, C.H.; Chiu, C.H.; Wang, S.W. and Cheng, W., 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20 enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 699-706.
۳۸. Magnadottir, B.; Lange, S.; Gudmundsdottir, S.; Bogwald, J. and Dalmo, R.A. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 19, pp: 429-439.



۵۴. Ringo, E.; Dimitroglou, A.; Hoseinifar, S.H. and Davies S.J., 2014. Probiotics in finfish: an update. In: Merrifield D, Ringø E, editors. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. Oxford, UK. Wiley Blackwell Publishing.
۵۵. Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. Vol. 172, pp: 92-63.
۵۶. Shen, W.Y.; Fu, L.L.; Li, W.F. and Zhu, Y.R., 2010. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 1691-1698.
۵۷. Sinha, A.K.; Kumar, V.; Makkar, H.P.S.; De Boeck, G. and Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition Areview. Food Chemistry. Vol. 127, pp: 1409-1426.
۵۸. Siwicki, A.; Klein, P.; Mornad, M.; Wiczka, W. and Studnicka, M., 1998. Immunostimulatory effects of dimerized lysozyme (KLP - 206) on the non specific defense mechanisms and protection against furunculosis in salmoni. Veterinary Immunol & Immunopathol. Vol. 61, pp: 369-378.
۵۹. Soltani, M.; Shafiei, S.; Yosefi, P.; Mosavi, S. and Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 37, No. 1, pp: 60-65.
۶۰. Sturkie, P.D., 1995. Avian physiology. (4th ed). Springer Verlag, New York. pp: 115-270.
۶۱. Sveinbjornsson, B.; Olsen, R. and Paulsen, S., 1996. Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease. Vol. 19, pp: 349-355.
۶۲. Swain, P.; Dash, S.; Sahoo, P.K.; Routray, P.; Sahoo, S.K.; Gupta, S.D.; Meher, P.K. and Sarangi, N., 2006. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 22, pp: 38-43.
۶۳. Tacon, A.G.J., 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp Argent Laboratories press. pp: 4-27.
۶۴. Thomas, S.N.; Edwin, L. and George, V.C., 2003. Catching efficiency of gill nets and trammel nets for penaeid prawns. Fisheries Research. Vol. 60, pp: 141-150.
۶۵. Treves Brown, K.M., 2000. Applied fish pharmacology. Springer publication. 309 p.
۶۶. Thrall, M.A., 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, USA. pp: 241:277-288, 402.
۶۷. Verlhac Trichet, V., 2010. Nutrition and immunity: an update. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 356-372.
۶۸. Waley, K. and North, J., 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: (A.W. Dodds and R.B. Sim eds.). Complement: A Practical Approach, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, Great Britain. pp: 19-47.
۶۹. Webb, A.; Maughan, M. and Knott, M., 2007. Pest fish profiles (*Trichogaster trichopterus* Three spot gourami). ACTFR, James Cook University. pp: 5-10.
۷۰. Yano, T., 1996. The nonspecific immune system: Humoral defence. In: Iwama G, Nakanishi T (eds.): The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, San Diego. pp: 105-157.
۷۱. Zhou, X.; Tian, Z. and Wang, Y., 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 36, pp: 501-509.
۳۹. Mahmoudzadeh, L.; Meshkini, S.; Tukmehchi, A.; Motalebi Moghanjoghi, A.A. and Mahmoudzadeh, M., 2016. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 15, No. 1, pp: 347-359.
۴۰. Marian, M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aqua. Vol. 237, pp: 9-20.
۴۱. Martínez Álvarez, R.M.; Morales, A.E. and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Rev Fish Biol. Vol. 15, pp: 75-88.
۴۲. 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. Vol. 23, pp: 892-896.
۴۳. Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunol. Vol. 29, pp: 2-14.
۴۴. Nikoskelainen, S.; Ouwelhand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 15, pp: 443-452.
۴۵. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Saoh, S. and Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 102, pp: 379-388.
۴۶. Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S. and Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 243, pp: 241-254.
۴۷. Pathiratne, A. and Rajapakshe, W., 1998. Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian Cichlid fish, *Etilapia suratensis*. Asian fisheries science. Vol. 11, pp: 203-211.
۴۸. Pettersson, A., 2005. Extracellular enzyme system utilized by the fungus (*Sporotrichum pulverulentum*) for breakdown of cellulase. European Journal of Biochemistry. Vol. 5, pp: 193- 206.
۴۹. Qinghui, A.; Kangsen, M.; Chunxiao, Z.; Qingyuan, D.; Beiping, T. and Zhiguo, L., 2004. Effect of dietary vitamin C on growth immune response of Japanese seabass, (*Lateolabrax japonicus*). Aquaculture. Vol. 242, pp: 489-500.
۵۰. Raa, J.; Roestad, G.; Engstad, R.E. and Robertsen, B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organism to microbial infections. In: Shariff IM, Subasin-ghe RP, Arthur JR (eds) Diseases in Asian aquaculture. Health Fish Section, Asian Fisheries Society, Manila. pp: 39-50.
۵۱. Reyes Becerril, M.; Tovar-Ramírez, D.; Ascencio Valle, F.; Civera Cerecedo, R.; Gracia López, V. and Barbosa Solomieu, V., 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquaculture. Vol. 280, No. 1, pp: 39-44.
۵۲. Ricker, W.E., 1979. Growth rates and models. Fish Physiology. Vol. 8, pp: 677-743.
۵۳. Ridha, M.T. and Azad, I.S., 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquaculture Resea. Vol. 43, pp: 843-852.

