اثرات ترکیبی اینولین و باکتری *اینتروکوکوس فاسیوم* در جیره‌ی غذایی بچه ماهیان بنی، *Mesopotamichthys sharpeyi* بر شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی سرم و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی

بهروز باجلان[۱]، محمد ذاکری[۲*]، سیدمحمد موسوی[۳]، وحید یاوری[۳] و ابراهیم رجب‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف مکمل غذایی ترکیبی پری‌بیوتیک و پروبیوتیک بر شاخص‌های خون‌شناسی، ترکیبات بیوشیمیایی سرم و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی در ماهیان بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) طراحی گردید. تعداد ۶۰۰ عدد ماهی با میانگین وزن اولیه ۳/۰±۸۳/۲۰ گرم در ۱۵ مخزن ذخیره‌سازی شدند. پنج تیمار غذایی حاوی پنج سطح ترکیبی، شامل تیمار اول (شاهد)، تنها حاوی جیره‌ی غذایی پایه و فاقد مکمل ترکیبی، تیمار دوم، ۵/۰ گرم در هر کیلوگرم غذای پایه، تیمار سوم، ۱ گرم در هر کیلوگرم غذای پایه، تیمار چهارم، ۵/۱ گرم در هر کیلوگرم غذای پایه و تیمار پنجم ۲ گرم در هر کیلوگرم غذای پایه مکمل ترکیبی پروبیوتیک *اینتروکوکوس فاسیوم* (5×10^{11} CFU/KG) و پری بیوتیک اینولین افزوده و با سه تکرار به مدت ۶۰ روز دوره‌ی آزمایش، در نظر گرفته شدند. نتایج شاخص‌های خونی به طور معنی‌داری افزایش تعداد گلبول‌های سفید و هماتوکریت و همچنین کاهش متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی و تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای آزمایشی را نشان داد. بیش‌ترین میزان شاخص گلبول‌های سفید در تیمار ۴ و بیش‌ترین درصد هماتوکریت و متوسط حجم گلبولی به طور معنی‌داری در تیمار ۵ مشاهده شد. در شاخص‌های بیوشیمیایی سرم نیز افزایش پروتئین کل و گلوبولین و کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید در ماهیان سین‌بیوتیکی مشاهده شد. بیش‌ترین میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم به طور معنی‌داری در تیمار ۴ به ترتیب به میزان ۰/۰۲±۳/۲۰، ۰/۰۲±۱/۱۱ و ۰/۰۴±۲/۰۹ گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد و کم‌ترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد ثبت شد. نتایج تنش‌های محیطی نشان داد که تیمارهای حاوی مکمل ترکیبی، مقاومت و درصد بازماندگی بیش‌تری را در تنش‌های حاد دمایی (پایین و بالا)، شوری و pH (اسیدی و قلیایی) نسبت به تیمار شاهد داشتند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایش حاضر، مقدار ۱/۵ تا ۲ گرم ترکیب اینولین و *اینتروکوکوس فاسیوم* بر کیلوگرم جیره غذایی مناسب و باعث بهبود سطح ایمنی غیراختصاصی در ماهی بنی می‌شود.

کلمات کلیدی: ماهی بنی، *اینتروکوکوس فاسیوم*، اینولین، تنش محیطی

مقدمه

در دهه‌ی اخیر توجه نسبت به استفاده از مکمل‌های غذایی ایمن‌تر بالا رفته و نظرها به جایگزینی پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها جلب شده است (Wang et al. 2008). استفاده ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک ممکن است باعث ایجاد نتایج تولیدی بهتری نسبت به استفاده‌ی منفرد از آن‌ها گردد (Merrifield et al. 2010). در آزمایش‌های متعددی که در آن‌ها استفاده از ترکیب پروبیوتیک و پری-بیوتیک در تغذیه‌ی آبزیان مختلف صورت گرفته است، نتایج بسیار مطلوبی همچون بهبود کارایی رشد و بازماندگی بالاتر، بهبود پاسخ ایمنی و خون‌شناختی،

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده‌ی منابع طبیعی‌دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

[۲*] دانشیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر E-mail: Zakeri.mhd@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] دانشیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

[۴] استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

افزایش آلبومین و پروتئین کل سرم، افزایش فلور باکتریایی مفید روده، کاهش نرخ مرگ و میر هنگام چالش با عوامل بیماری‌زا در ماهی و میگو به دست آمده است (Zhang et al. 2011, Lin et al. 2012). از مهم‌ترین ویژگی‌های ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک این است که ضمن کاهش بیماری، هیچ باقی‌مانده‌ی بافتی نداشته و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت باکتریایی ایجاد نمی‌نمایند (Irianto and Austin 2002).

نتایج آزمایش‌ها نشان داده که استفاده از پروبیوتیک-های باکتری اسیدلاکتیک بهترین انتخاب، نه فقط برای بالا بردن تعداد باکتری‌های مفید در جیره‌ی غذایی، بلکه به عنوان باکتری‌های سازگار طبیعی با محیط روده می‌باشند (Klare et al. 2003). ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده، آن‌ها را آماده رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها می‌نماید. *اینتروکوکوس فاسیوم* (*Entrococcus faecium*)، باعث ایجاد یک فلور طبیعی پایدار در دستگاه گوارش شده و با رشد سریع و اسیدی کردن محیط، مانع رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردد (Eaton and Gasson 2001). باکتری *E. faecium* غیربیماری‌زا بوده و توانایی تولید اسیدلاکتیک و باکتریوسین را دارد (Wang et al. 2008). باکتریوسین‌ها ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضدمیکروبی هستند که می‌توانند باعث تحریک سیستم ایمنی و حفاظت از حیوانات در مقابل بیماری‌های دستگاه گوارش شوند (Taras et al. 2006). همچنین فروکتوالیگوساکارید (FOS) دارای خواص پری‌بیوتیکی بوده و به صورت انتخابی باعث تحریک رشد باکتری بیفیدوباکتریوم می‌گردد. این باکتری مفید به همراه پروبیوتیک *E. faecium* باعث پایداری میکروفلور روده شده و به عنوان سدی در مقابل اجرام بیماری‌زا عمل می‌نماید (Mehrabi et al. 2011). پری‌بیوتیک‌ها غیرقابل هضم بوده و به سختی در داخل دهان و روده توسط باکتری‌های بیماری‌زا تخمیر می‌شوند، ولی به خوبی توسط باکتری‌های مفید معرفی شده از طریق مکمل غذایی، داخل روده تخمیر می‌گردند (Kunlee and Salminen 2009). در میان پری‌بیوتیک‌ها، FOS ها و اینولین بیش‌ترین اثر را بر تحریک رشد و فعالیت بیفیدوباکتری‌ها دارند (Vulevic et al. 2004). این موضوع سبب غلبه‌ی بیفیدوباکتریوم‌ها بر باکتری‌های مضر روده‌ای و افزایش مقاومت موجود در برابر تنش‌های محیطی می‌گردد.

تنش را می‌توان منشأ اصلی بروز مشکلاتی نظیر کاهش رشد، بیماری‌ها و تلفات در تولید دانست. از عوامل مؤثر در کاهش بروز تنش در مزرعه، مدیریت تغذیه است که می‌تواند در تولید موفق آبزیان تأثیرگذار باشد. در نتیجه به کارگیری مکمل‌های غذایی و بهبود سیستم ایمنی در آبزیان باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر انواع تنش‌های محیطی می گردد. عامل تنش‌زا در حالت فیزیولوژیکی جانور تغییراتی ایجاد می‌کند، که به عنوان حساسیت یا پاسخ به تنش تفسیر می‌گردد (Kosha at al. 2006). تمامی حیوانات مهره‌دار دارای توانایی محدود سازگاری نسبت به تنش‌های محیطی هستند و تلاش می‌کنند تا وضعیت پایدار و تعادل خود را در شرایط متنوع محیطی حفظ نمایند. چنین کیفیتی به عنوان الگوی حفظ تعادل (حفظ حیات) تعریف می‌شود. در بین گونه‌های ماهیان تفاوت قابل توجهی در نوع و سطح پاسخ و میزان حساسیت به یک عامل تنش مشابه وجود دارد. در نتیجه مفهوم تنش نباید به عنوان یک واکنش فیزیولوژیکی از پیش تعیین شده، مشخص شده و یکسان برای تمام گونه-ها شناخته شود (Bahrami Babahydari et al. 2013). بنابراین با افزایش تقاضا برای پرورش ماهیان گرمابی از جمله ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) در سال‌های اخیر، استفاده و معرفی یک مکمل غذایی مناسب که بتواند باعث بهبود کارایی تولید گردد، لازم به نظر می-رسد. در نتیجه آزمایش حاضر در جهت پیشبرد تولید ماهی سالم با به کارگیری مکمل غذایی ترکیبی و با هدف بهبود سلامت و افزایش کیفیت محصول و مقاومت برابر تنش‌های محیطی در پرورش این گونه بومی هدف‌گذاری گردید.

مواد و روش کار

۷۴۰ قطعه بچه ماهی بنی از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهید ملکی اهواز به آزمایشگاه خیس دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند و به مدت ۱۴ روز با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. سپس تعداد ۶۰۰ قطعه بنی با میانگین وزن اولیه ۳/۸۲±۰/۲۰ گرم و طول اولیه‌ی ۷۷/۶±۳۸/۰ سانتی‌متر به صورت کاملاً تصادفی در ۱۵ تانک استوانه‌ای پلی‌اتیلنی ۳۰۰ لیتری دارای هوادهی مناسب توزیع گردیدند (به ازای هر مخزن ۴۰ قطعه ماهی جوان بنی). به منظور بررسی اثرات ترکیبی مکمل غذایی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین بر شاخص‌های خون‌شناسی، ترکیبات بیوشیمیایی سرم و شاخص مقاومت در برابر تنش در ماهیان بنی، ۵ تیمار غذایی با سه تکرار به مدت ۶۰ روز دوره‌ی آزمایش، در نظر گرفته شد.

تیمارهای غذایی حاوی پنج سطح مختلف ترکیبی مکمل غذایی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین در جیره‌ی غذایی بودند (مکمل سین بیوتیک تهیه شده از شرکت بایومین ایمبو، اتریش). به طوری که تیمار اول (شاهد) تنها شامل جیره‌ی غذایی پایه و فاقد مکمل ترکیبی، تیمار دوم ۵/۰ گرم در هر کیلوگرم جیره‌ی غذای پایه، تیمار سوم ۱ گرم در هر کیلوگرم جیره‌ی غذای پایه، تیمار چهارم ۵/۱ گرم در هر کیلوگرم جیره‌ی غذای پایه و تیمار پنجم ۲ گرم در هر کیلوگرم جیره‌ی غذای پایه، مکمل ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین اضافه گردید. در این آزمایش ترکیب مکمل غذایی شامل مخلوطی از پروبیوتیک *اینتروکوکوس فاسیوم* (5×10^{11} CFU/KG)، ۶۰ درصد وزن ترکیب مکمل غذایی) و فروکتوالیگوساکاریدی با نام اینولین به عنوان پری‌بیوتیک (۴۰ درصد وزن ترکیب) است. آنالیز بیوشیمیایی جیره‌ی غذایی پایه‌ی مورد استفاده شامل ۳۶/۶۴±۰/۱۹ درصد پروتئین، ۸/۳۸±۰/۵۱ درصد چربی، ۳۶/۰۲±۰/۴۸ درصد کربوهیدرات، ۱۰/۱۴±۰/۱۹ درصد رطوبت و ۸/۸۲±۰/۲۸ درصد خاکستر است. انرژی کل محاسبه شده برای جیره‌ی غذایی ۱/۸۱±۰/۰۲ مگا ژول بر گرم و اندازه‌ی دانه‌های غذایی ۲ میلی‌متر می‌باشد. جیره‌های غذایی در این آزمایش به اندازه‌ی نیاز و هر دو هفته یک بار آماده‌سازی شدند و در کیسه‌های نایلونی تیره بسته‌بندی و نام‌گذاری و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. در طول دوره‌ی آزمایش ماهیان بنی در تیمارهای مختلف غذایی در طی سه نوبت در روز در ساعات ۸:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۸:۰۰ به میزان ۳ درصد وزن تر بدن با جیره‌های غذایی مربوطه غذادهی شدند. در طول دوره‌ی آزمایش هر دو هفته میزان خوراک مصرفی بر مبنای افزایش بیوماس هر تانک، اصلاح گردید.

در طی دوره‌ی انجام تحقیق فاکتورهای کیفی آب شامل درجه‌ی حرارت آب، pH، میزان شوری و سطح اکسیژن محلول به طور روزانه هنگام صبح با استفاده از مولتی‌متر مدل HQ40d ساخت آلمان پایش و ثبت شدند. به طوری که در طول دوره‌ی آزمایش؛ میانگین درجه‌ی حرارت آب در طول دوره در دامنه‌ی ۲۷/۰۱±۱/۴۷ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ میانگین pH در محدوده‌ی ۸/۰۲±۰/۱۹؛ میانگین شوری آب در محدوده‌ی ۳/۰±۱۱/۲۴ قسمت در هزار (ppt) و میانگین سطح اکسیژن محلول ۸/۲۰±۱/۱۱ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید. در طول دوره آزمایش هوادهی به طور دائمی جهت نگهداری اکسیژن در حد مطلوب انجام گردید. از تناوب نوری طبیعی در این تحقیق استفاده گردید به طوری که بین ۱۴-۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴-۱۰ ساعت تاریکی متغیر بود. منبع آب شهری جهت تأمین آب استفاده گردید به طوری که آب شهری پس از انبار شدن در تانک‌های ۱۰۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی به مدت ۴۸ ساعت و هوادهی مداوم جهت مصرف در آزمایش استفاده شد. همچنین در طی دوره‌ی آزمایش جهت بهبود کیفی آب و کدورت آن در هر روز تقریباً ۱۰ درصد از آب تانک‌های پرورشی تعویض گردید.

جهت محاسبه‌ی هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct)، شمارش کلی تعداد گلبول قرمز (RBC)، شمارش کلی تعداد گلبول سفید (WBC)، شمارش افتراقی گلبول-های سفید، شاخص‌های ثانویه‌ی گلبول‌های قرمز و همچنین به دست آوردن سرم خون برای سنجش شاخص‌های بیوشیمایی سرمی، خون‌گیری در پایان دوره از ۹ ماهی بنی در هر تیمار انجام شد. خون‌گیری با استفاده از سرنگ ۱ سی‌سی از سیاهرگ ساقه‌ی دمی انجام گرفت و به داخل تیوپ‌های اپندورف (حاوی هپارین به عنوان ماده‌ی ضدانعقاد) ریخته شدند و به آزمایشگاه جهت سنجش شاخص‌های خونی منتقل گردیدند. هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت هموگلوبین محاسبه شد (Feldman et al. 2000). همچنین حجم فشرده‌ی گلبولی با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفیوژ نمونه صورت گرفت (Thrall 2004). میزان هماتوکریت بر اساس روش کار استاندارد اندازه‌گیری شد (Morris and Davey 1996). شمارش گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید با استفاده از روش کار استاندارد محاسبه گردید (Donaldson 1981, Thrall 2004). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با تهیه‌ی گسترش خونی و مطالعه‌ی آن با میکروسکوپ نوری جهت تعیین درصد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها انجام‌گرفت (Houston 1990). شاخص‌های ثانویه‌ی گلبول‌های قرمز شامل متوسط حجم گلبولی (MCV)، متوسط هموگلوبولین گلبولی (MHC) و متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) با استفاده از رابطه‌های استاندارد محاسبه گردید (Thrall 2004).

جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، نمونه-های خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ (rpm) سانتریفیوژ (Hettich D-7200 Tuttlingen, Germany) شدند. شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل پروتئین کل، آلبومین کل، گلوبولین، کلسترول و تری‌گلیسرید به وسیله‌ی دستگاه اتوآنالایزر (Mindray BS-200, China) سنجیده شدند. مقدار پروتئین کل و آلبومین کل سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون به روش فتومتریک در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد (Johnson et al. 1999). میزان گلوبولین از تفاضل پروتئین کل از آلبومین کل سرم محاسبه شد (Kumar et al. 2005). جهت تعیین مقدار کلسترول کل و تری-گلیسرید سرم از روش آنزیمی، کالری‌متری (GOD-PAP) استفاده شد. تعیین مقادیر کلسترول کل و تری‌گلیسرید سرم در طول موج ۵۴۶ نانومتر با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون انجام شد.

در پایان ۶۰ روز آزمایش به منظور سنجش میزان مقاومت تیمارهای تغذیه شده با مکمل غذایی ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین با تیمار شاهد، آزمایش-های تنش‌زایی دمایی، شوری و pH جهت تعیین میزان بازماندگی و در نهایت سطح مقاومت تیمارها طراحی گردید. ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش‌های تنش، غذادهی ماهیان قطع گردید. تعداد ۳۰ قطعه ماهی از هر تیمار آزمایشی تحت تنش حاد دمایی قرار گرفتند. دمای مطلوب پرورش ماهی بنی، ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد می-باشد (Minabi et al. 2013). ماهیان تحت تنش حاد دمای پایین (۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و تنش حاد دمای بالا (۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) مورد آزمایش قرار گرفتند (Esmaeili et al. 2011).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ در سطح خطای ۰/۰۵ استفاده شد. از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) جهت اندازه‌گیری اختلاف بین تیمارهای جیره‌ی غذایی ($P<۰/۰۵$) استفاده شد. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها در صورت همگنی واریانس‌ها از پس آزمون Tukey جهت تعیین اختلاف بین تیمارها استفاده گردید. داده‌ها در نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شده‌اند.

نتایج

در جدول ۱ نتایج مقایسه‌ی میانگین شاخص‌های خونی شامل شمارش تعداد گلوبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبولین، درصد هماتوکریت و شاخص‌های ثانویه‌ی خون (شامل MCV، MCH و MCHC) در ماهیان جوان بنی نسبت به اثر ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین بعد از ۶۰ روز آورده شده است. نتایج بررسی شمارش گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، متوسط حجم گلبولی و متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی در میان تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای ترکیبی و تیمار شاهد نشان داد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان شاخص گلبول‌های سفید در تیمار ۴ و به میزان ۴/۲۵±۰/۰۴ (هزار سلول در میلی‌متر مکعب خون) و کم‌ترین آن در تیمار شاهد و به میزان ۴/۰۶±۰/۰۳ (هزار سلول در میلی‌متر مکعب خون) ثبت گردید. بیش-ترین درصد هماتوکریت و متوسط حجم گلبولی به طور معنی‌داری در تیمار ۵ به ترتیب به میزان ۴۲/۰۰±۰/۵۸ درصد و ۳۷۱/۲۱±۱۱/۶۶ فمتولیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۳۱/۳۳±۰/۳۳ درصد و ۲۶۴/۹۶±۳/۵۱ فمتولیتر ثبت شد. در نتایج متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۲ و ۳ با تیمار شاهد و تیمار ۴ و ۵ مشاهده گردید (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی در ماهیان آزمایشی در تیمار۳ (۱ گرم مکمل ترکیبی در هر کیلوگرم جیره‌ی غذایی) به میزان ۲۵/۲۲±۰/۴۳ گرم بر دسی‌لیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار ۵ به میزان ۱۹/۱۳±۰/۰۷ گرم بر دسی‌لیتر ثبت شد. با بررسی نتایج میزان گلبول قرمز خون، غلظت هموگلوبین و متوسط هموگلوبین گلبولی بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). همچنین در شمارش تفریقی گلبول‌های سفید نیز بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۱: شاخص‌های خونی ماهیان جوان بنی (*M. sharpeyi*) تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل غذایی ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین در پایان ۶۰ روز آزمایش (n=۹)

شاخص	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
گلبول‌های قرمز (m/µl)	۱/۰±۱۸/۰۳	۱/۰±۱۸/۰۱	۱/۰±۱۸/۰۲	۱/۰±۱۹/۰۵	۱/۰±۱۳/۰۳
گلبول‌های سفید (k/µl)	۴/۰±۰۶/۰۳[a]	۴/۰±۱۲/۰۴[ab]	۴/۰±۱۷/۰۳[ab]	۴/۰±۲۵/۰۴[b]	۴/۰±۱۷/۰۴[ab]
هموگلوبین (g/dl)	۷/۰±۹۰/۰۶	۸/۰±۰۰/۰۶	۷/۰±۹۱/۰۶	۸/۰±۰۰/۰۶	۸/۰±۰۳/۰۹
هماتوکریت (٪)	۳۱/۰±۳۳/۳۳[a]	۳۳/۰±۳۳/۳۳[a]	۳۸/۰±۳۳/۸۸[b]	۴۱/۰±۳۳/۲۰[bc]	۴۲/۰±۰۰/۵۸[c]
متوسط حجم گلبولی (fl)	۲۶۴/۳±۹۶/۵۱[a]	۲۸۲/۳±۵۴/۹۲[ab]	۳۲۵/۴±۸۱/۸۸[bc]	۳۴۸/۵±۵۳/۹۰[c]	۳۷۱/۶±۲۱/۶۶[c]
متوسط هموگلوبولین گلبولی (pg)	۶۶/۱±۸۲/۱۵	۶۷/۰±۸۱/۶۰	۶۷/۰±۱۸/۹۶	۶۷/۲±۲۷/۶۹	۷۱/۲±۰۱/۳۱
متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی (٪)	۲۰/۰±۶۳/۵۴[a]	۲۴/۰±۰۱/۴۰[b]	۲۵/۰±۲۲/۴۳[b]	۱۹/۰±۳۹/۶۲[a]	۱۹/۰±۱۳/۰۷[a]
لنفوسیت (٪)	۷۰/۰±۶۷/۳۳	۷۰/۰±۳۳/۳۳	۷۰/۰±۶۷/۳۳	۷۰/۰±۶۷/۳۳	۷۱/۰±۶۷/۳۳
مونوسیت (٪)	۲۲/۰±۰۰/۵۷	۲۱/۰±۰۰/۵۷	۲۰/۰±۳۳/۳۳	۲۰/۰±۶۷/۶۷	۲۰/۰±۰۰/۵۷
نوتروفیل (٪)	۷/۰±۳۳/۳۳	۸/۰±۶۷/۸۸	۹/۰±۰۰/۵۷	۸/۰±۶۷/۳۳	۸/۰±۳۳/۶۷

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه‌ی وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵، میانگین ± خطای استاندارد)

نتایج سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم ماهیان جوان بنی (*M. sharpeyi*) تغذیه با سطوح مختلف ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در تمامی شاخص‌های بیوشیمیایی سنجیده شده، در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بین تیمارهای ۴ و ۵ با تیمار شاهد و تیمار ۲ و با تیمار ۳ آزمایش اختلاف معنی‌داری در سنجش پروتئین کل سرم وجود دارد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان پروتئین کل سرم و آلبومین سرم به طور معنی‌داری در تیمار ۴ به ترتیب به میزان ۳/۲۰±۰/۰۲ گرم بر دسی‌لیتر و ۱/۱۱±۰/۰۲ گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۲/۵۳±۰/۰۱ گرم بر دسی‌لیتر و ۰/۶۷±۰/۰۱ گرم بر دسی‌لیتر ثبت شد. همچنین بیش‌ترین میزان گلوبولین سرم در تیمار ۴ و به میزان ۲/۰۹±۰/۰۴ گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد به میزان ۱/۸۶±۰/۰۲ گرم بر دسی‌لیتر ثبت شد. هر چند که بیش‌ترین میزان کلسترول و تری‌گلیسرید سرم در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان کلسترول در تیمار ۵ و برای تری‌گلیسرید در تیمار ۴ ثبت گردید و بین این تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P>۰/۰۵).

جدول ۲: شاخص‌های بیوشیمیایی سرم ماهیان جوان بنی (*M. sharpeyi*) تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل غذایی ترکیبی *اینتروکوکوس فاسیوم* و اینولین در پایان ۶۰ روز آزمایش (n=۹)

شاخص	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
پروتئین تام (g/dl)	۲/۰±۵۳/۰۱^{a}	۲/۰±۵۷/۰۱^{a}	۲/۰±۹۴/۰۱^{b}	۳/۰±۲۰/۰۲^{c}	۳/۰±۰۸/۰۴^{c}
آلبومین (g/dl)	۰/۰±۶۷/۰۱^{a}	۰/۰±۷۰/۰۱^{a}	۰/۰±۹۶/۰۱^{b}	۱/۰±۱۱/۰۲^{c}	۱/۰±۰۸/۰۳^{c}
گلوبولین (g/dl)	۱/۰±۸۶/۰۲^{a}	۱/۰±۸۷/۰۲^{a}	۱/۰±۹۸/۰۲^{ab}	۲/۰±۰۹/۰۴^{b}	۲/۰±۰۱/۰۶^{ab}
کلسترول (mg/dl)	۳۱۲/۵±۰۰/۵۹^{b}	۳۱۱/۵±۳۳/۷۰^{b}	۲۷۶/۵±۰۰/۱۳^{a}	۲۷۲/۷±۳۳/۶۹^{a}	۲۶۸/۵±۳۳/۷۰^{a}
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۲۴۳/۱۱±۰۰/۷۹^{b}	۲۱۱/۴±۰۰/۰۴^{ab}	۱۹۲/۴±۳۳/۹۸^{a}	۱۷۵/۸±۰۰/۶۶^{a}	۱۸۲/۷±۶۷/۶۹^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه‌ی وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵، میانگین ± خطای استاندارد)

نتایج تنش‌های آزمایش شده بر روی ماهیان جوان بنی تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل غذایی ترکیبی در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در تمامی تنش‌های مختلف آزمایش شده در بین تیمارهای آزمایشی سین‌بیوتیکی و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از آزمایش تنش حاد دمایی نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۴ و ۵ با تیمار شاهد و تیمارهای ۲ و ۳ وجود دارد (P>۰/۰۵). کم‌ترین و بیش‌ترین میزان مقاومت بازماندگی در برابر تنش حاد دمای پایین (۵ درجه‌ی سانتی‌گراد)، به ترتیب در تیمار شاهد به مدت ۲۷۰/۸۹±۳۶/۴۱ ثانیه و تیمار ۴ به مدت ۱۴۳۰/۳۳±۱۲۲/۸۹ ثانیه مشاهده گردید. کم‌ترین و بیش‌ترین میزان مقاومت در برابر تنش حاد دمای بالا (۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد)، به ترتیب در تیمار شاهد به مدت ۵۱/۵۶±۶/۷۳ ثانیه و تیمار ۵ به مدت ۲۰۸/۸۹±۲۳/۵۴ ثانیه مشاهده گردید. نتایج تیمارهای ۴ و ۵ سین‌بیوتیکی در مقاومت برابر تنش حاد دمایی (دمای پایین و بالا) اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P>۰/۰۵). کم‌ترین میزان مقاومت بازماندگی در برابر تنش حاد شوری (۳۵ ppt)، در تیمار شاهد و به مدت ۳۱/۳۳±۴/۵۸ ثانیه ثبت گردید. بیش‌ترین میزان مقاومت بازماندگی در برابر این تنش، در تیمار ۴ و به مدت ۲۸۸/۸۹±۳۰/۵۶ ثانیه مشاهده شد. کم‌ترین و بیش‌ترین

میزان مقاومت بازماندگی در برابر تنش حاد pH اسیدی (pH=۳/۵) و pH قلیایی (pH=۱۲) به ترتیب در تیمار شاهد (به ترتیب به مدت ۳۲۲±۳۲/۱۷ و ۲۳/۲۲±۴/۷۳ ثانیه) و در تیمار ۵ (به ترتیب به مدت ۸۴۷/۷۸±۵۸/۰۴ و ۴۶۴/۵۶±۳۵/۸۱ ثانیه) مشاهده گردید. نتایج تیمارهای ۳، ۴ و ۵ در مقاومت برابر تنش حاد pH (اسیدی و قلیایی) اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد و تیمار ۲ نشان دادند (P>۰/۰۵).

جدول ۳: تنش‌های حاد دمایی، شوری و pH بر ماهیان جوان بنی (*M. sharpeyi*) تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل غذایی سین‌بیوتیک در پایان آزمایش

تنش‌های حاد (زنده‌مانی به ثانیه)	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
دما ۵ ^{O}C	۲۷۰/۳۶±۸۹/۴۱^{a}	۳۴۳/۲۷±۸۹/۳۶^{a}	۵۴۷/۱۲۱±۴۴/۰۹^{a}	۱۴۳۰/۱۲۲±۳۳/۸۹^{b}	۱۲۶۲/۹۲±۵۶/۲۹^{b}
دما ۴۰ ^{O}C	۵۱/۶±۵۶/۷۳^{a}	۸۰/۱۱±۳۳/۳۸^{ab}	۱۳۰/۹±۷۸/۸۳^{b}	۱۹۸/۱۵±۴۴/۲۰^{c}	۲۰۸/۲۳±۸۹/۵۴^{c}
شوری ۳۵ ppt	۳۱/۴±۳۳/۵۸^{a}	۹۶/۱۴±۸۹/۴۸^{a}	۱۰۳/۲۱±۲۲/۷۹^{a}	۲۸۸/۳۰±۸۹/۵۶^{b}	۲۷۰/۳۵±۶۷/۹۰^{b}
pH=۳/۵	۳۲۲/۳۲±۰۰/۱۷^{a}	۳۷۸/۳۱±۸۹/۲۰^{a}	۶۲۴/۴۸±۱۱/۴۰^{b}	۸۳۴/۵۸±۷۸/۹۲^{c}	۸۴۷/۵۸±۷۸/۰۴^{c}
pH=۱۲	۲۳/۴±۲۲/۷۳^{a}	۵۷/۷±۸۹/۴۷^{a}	۲۱۹/۵۱±۵۶/۶۹^{b}	۳۹۸/۴۰±۸۹/۱۰^{c}	۴۶۴/۳۵±۵۶/۸۱^{c}

حروف متفاوت در هر ردیف نشانه‌ی وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵، میانگین ± خطای استاندارد)

بحث

افزایش تراکم تولید از روش‌های مورد استفاده در بالا بردن فرآیند تولید می‌باشد، اما این امر ممکن است احتمال ابتلا به بیماری را در آبزیان پرورشی به سبب پایین آمدن کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط تنش‌زا، افزایش دهد (Burr et al. 2005). عفونت‌های باکتریایی اغلب آبزیان پرورشی را تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. شرایط تنش-زای حاصل از این امر باعث به خطر افتادن سیستم ایمنی در آبزی می‌گردد. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان این عفونت‌ها، درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Burr et al. 2005). اخیراً استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مدیریت بیماری‌های آبزیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است (Mehrabi et al. 2011). همچنین همواره این مطلب بیان شده که پیش‌گیری بهتر از درمان است. بنابراین یکی از راه‌کارهایی که برای کاهش نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است، استفاده از مکمل‌های غذایی طبیعی و ایمن مانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها است که علاوه بر افزایش رشد اثرات سودمندی بر ایمنی میزبان دارند (Hoseinifar et al. 2011). هدف مدیریت تغذیه‌ای در آبزیان علاوه بر بهبود رشد و تولید، از سوی دیگر دسترسی به جیره‌های غذایی مناسب می‌باشد که باعث افزایش مقاومت بدن آبزی در برابر تنش‌های محیطی گردد، چرا که مزارع پرورشی نیمه متراکم تحت تأثیر تنش‌ها و نوسانات محیطی قرار دارند و این امر اجتناب‌ناپذیر لزوم بهره‌گیری از مکمل‌های غذایی مفید و کارآمد برای آمادگی و مقابله با این تنش‌های محیطی را نشان می‌دهد. مکمل غذایی ترکیبی مزایای پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها را به صورت توأم دارند و علاوه بر تغییر توازن فلور باکتریایی روده به سمت باکتری‌های بالقوه مفید اثرات بسیار زیادی بر بافت روده و کبد ماهیان دارند (Jafaryan et al. 2007). سین‌بیوتیک‌ها بر خلاف واکسن‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و مکمل‌های غذایی گران‌قیمت، بدون تحمیل هزینه‌ی زیاد به کارگاه‌های پرورش آبزیان و ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم، قادر به

کاهش بروز بیماری از طریق افزایش سطوح ایمنی و بهبود وضعیت فیزیولوژی ماهی هستند (Hoseinifar et al. 2011).

شاخص‌های خونی ارتباط نزدیکی با شرایط زیست-محیطی جانور دارد و محیطی که موجود در آن زندگی می‌کند بر شاخص‌های خونی آن تأثیرگذار است (Vazquez-juarez 2005). شاخص‌های خون‌شناسی از جمله میزان هموگلوبین و هماتوکریت اطلاعات با ارزشی را برای پرورش‌دهندگان آبزیان به عنوان شاخص مناسبی از وضعیت سلامت ماهی و واکنش به تنش‌های محیطی فراهم می‌کند (Kazemi et al. 2010). استفاده از مکمل ترکیبی در جیره‌ی غذایی تیمارهای آزمایش حاضر در تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت و متوسط حجم گلبولی افزایش معنی‌داری بین تیمارهای سین-بیوتیکی نسبت به تیمار شاهد به وجود آورد، که دلیل آن احتمالاً سلامت و شرایط بهتر فیزیولوژیک ماهیان تیمارهای ترکیبی (Bahrami Babahydari et al. 2013) نسبت به تیمار شاهد می‌باشد. به طور کلی محققان بر این باورند که عوامل خونی در ماهیان مختلف باهم تفاوت داشته و ارتباط زیادی با شرایط محیط پرورش، اندازه و سن ماهی، نوع گونه، کمیت و کیفیت غذا دارند (Kazemi et al. 2010). محاسبه‌ی غلظت هموگلوبین خون روشی سریع برای شناسایی شرایط بیماری مانند عارضه‌ی کم‌خونی در ماهیان است. هماتوکریت روشی برای اندازه‌گیری حجم توده‌ای یا ذره‌ای گلبول‌های قرمز نسبت به حجم کل خون است (Ahmadi et al. 2010).

Yar-Ahmadi و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر مکمل غذایی سین‌بیوتیک روی شاخص‌های خون-شناسی ماهیان انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرداخته و گزارش کردند که جیره‌های مکمل شده با سین‌بیوتیک تأثیری بر تعداد گلبول‌های قرمز و شاخص‌های ثانویه خون (اعم از MCV، MCH و MCHC) نداشتند و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نگردید. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که شاخص‌های خون‌شناسی در آبزیان تحت تأثیر متغیرهایی نظیر گونه، سن و درجه‌ی حرارت، جنس، ترکیبات شیمیایی، سختی و pH آب هرگونه بستگی دارد (Fanouraki et al. 2007). هر چند که مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که شاخص‌های ثانویه‌ی خون ماهیان در گونه‌های مختلف، متفاوت بوده و از دامنه‌ی نسبتاً وسیعی برخوردار می‌باشد (Feldman et al. 2000). گزارش‌های محدودی از تأثیر محرک‌های ایمنی در مورد شاخص‌های ثانویه‌ی خون موجود است که برخی از این گزارش‌ها افزایش این شاخص‌ها (Ekanem and Usuf 2008, Kokdil et al. 2006) و برخی کاهش این شاخص-های ثانویه خون (Harikrishnan et al. 2009) را گزارش نموده‌اند؛ البته برخی گزارش‌ها نیز عدم تأثیر معنی‌دار محرک ایمنی بر این شاخص‌ها را اثبات کرده‌اند (Tatina et al. 2010). بنابراین با توجه به اختلافات زیاد از نتایج مطالعات مختلف می‌توان عنوان نمود که که شاخص‌های ثانویه خون به تنهایی معرف مناسبی برای تعیین وضعیت تحریک ایمنی توسط مکمل‌های افزوده شده به جیره‌ی غذایی نبوده و بیش‌تر تحت تأثیر شاخص‌های دیگر محیطی (به ویژه فصل، سن و دما) قرار می‌گیرد (Beit Sayah et al. 2012).

نتایج شاخص‌های بیوشیمیایی سرم حاصل از آزمایش حاضر نشان‌دهنده‌ی وجود افزایش معنی‌دار در محتوای پروتئین سرم، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای حاوی مکمل غذایی ترکیبی پروبیوتیک و پری‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد است. این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده‌ی تقویت سیستم ایمنی در ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی باشد (Mehrabi et al. 2011). به طوری که سایر محققین افزایش سطوح پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در سرم ماهیان را موجب تقویت سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها پس از مصرف محرک‌های ایمنی دانسته‌اند (Andrews et al. 2011, Jha et al. 2007). در مطالعه‌ای بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان دادند که تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با جیره‌های پروبیوتیکی

افزایش معنی‌داری در پروتئین کل سرم خون نسبت به تیمار شاهد داشتند (Sharifuzzaman and Austin 2009). پروتئین سرم، سیستم بیوشیمیایی نسبتاً ناپایدار است که بازتاب دقیقی از شرایطی است که موجود در آن قرار دارد. این شاخص تحت تأثیر شرایط داخلی و خارجی تغییر می‌کند. پروتئین کل عموماً تحت تأثیر حجم پلاسما ذخیره پروتئینی بافت‌ها، به ویژه بافت کبد، تغییر میزان آلبومین و گلوبولین تغییر می‌کند (Yousefian et al. 2010) . همچنین جنسیت، تخم‌ریزی، تغذیه، فشار اسمزی، دما، نور، سن، هورمون‌های زمستان گذرانی و میزان اکسیژن می‌تواند از شاخص‌های مؤثر بر محتوای پروتئین کل سرم در ماهی است (Kubilay and Ulukoy 2002). محتوای پروتئین کل سرم نشان‌دهنده‌ی وضعیت تغذیه‌ای و متابولیکی ماهی است و به طور غیرمستقیم نشان‌دهنده‌ی سطح ایمنی غیراختصاصی در ماهی محسوب می‌شود (Havsteen 2002). آلبومین سبک‌ترین پروتئین سرم خون بوده و بیش از نیمی از پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد (Kazemi et al. 2010). آلبومین اهمیت زیادی در حفظ فشار اسمزی در عروق، حفظ ذخیره‌ی نیتروژنی برای رشد و ترمیم بافت‌ها و نیز به عنوان پروتئین حامل مواد مختلف اعم از داروها، لیپیدها، هورمون‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌ها می‌باشد (Banaee et al. 2010). Mehrabi و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر سین‌بیوتیک را بر شاخص‌های بیوشمیایی سرم در ماهیان بررسی و گزارش کردند که میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مکمل غذایی سین‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کردند. گلوبولین‌ها گروه دیگری از پروتئین-های کل پلاسمایی می‌باشند که نقش مهمی در فعالیت-های ایمنولوژیکی ایفا می‌کند و افزایش آن‌ها موجب تقویت سیستم ایمنی ذاتی ماهیان می‌گردد (Andrews et al. 2011). در بررسی تأثیر مخمر *Saccharomyces cervisae* و پروبیوتیک *Bacillus subtilis* در جیره‌ی غذایی ماهیان کپور معمولی، نتایج بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم تیمارهای آزمایش، افزایش معنی‌داری در میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در ماهیان تغذیه شده با مکمل نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید (Ghodratizadeh et al. 2011). نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر محققان در راستای افزایش سطح پروتئین کل سرم خون ماهیان تغذیه شده با دیگر مکمل‌های پروبیوتیکی، تأییدکننده‌ی اثر مثبت این مکمل‌ها در افزایش ایمنی ذاتی است (Nayak et al. 2007, Wang et al. 2008).

در نتایج آزمایش حاضر از میزان کلسترول و تری-گلیسرید سرم ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی نسبت به تیمار شاهد کاسته شده است. به نظر می‌رسد با هیدرولیز بیش‌تر میزان کلسترول و تری‌گلیسرید سرم و استفاده‌ی بهینه از آنان و از طرفی جلوگیری از افزایش و تجمع این مواد در بدن، بر سلامت ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی افزوده شده باشد (Jha et al. 2007). در بررسی اثر منفرد و ترکیبی (سین‌بیوتیکی) مکمل‌های فروکتوالیگوساکارید، مانان اولیگوساکارید و *Bacillus clausii* روی ماهیان جوان کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) مشاهده گردید که در تمام تیمارهای سین‌بیوتیکی آزمایش، میزان سطح تری‌گلیسرید نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی-داری داشت (Ye et al. 2011). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان نمود که افزودن مکمل ترکیبی پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به جیره‌ی غذایی نقش مهمی در بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهیان جوان بنی داشته و این نتیجه می‌تواند سهم به سزایی در افزایش ایمنی و سلامت این ماهیان در مواجهه با بیماری‌ها و کاهش تلفات آن‌ها داشته باشد (Mehrabi et al. 2011).

کاهش کیفیت آب پرورشی خود به عنوان عامل تنش‌زا عمل می کند و باعث کاهش مقاومت بدن و در نهایت مستعد شدن برای دریافت بیماری می‌شود (Floyd 2009). در نتیجه حفظ شرایط محیطی در حد مطلوب و مقاوم-سازی ماهیان به ایجاد شرایطی استاندارد برای پرورش کمک می کند. در حضور پری‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های

پروبیوتیکی رشد و تکثیر یافته و میزان زیادی باکتریوسین تولید می‌کنند که ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی هستند و مانع از رشد و تکثیر باکتری‌های مضر در هنگام تنش می‌گردند (Yar Ahmadi et al. 2014). پروبیوتیک‌ها از یک‌سو با بهینه‌سازی شاخص‌های کیفی آب موجب ایجاد شرایط مناسب زیستی برای آبزیان پرورشی شده و از سوی دیگر با ترشح برخی مواد خارج سلولی از جمله آنزیم‌های گوارشی موجب هضم و جذب بهتر مواد غذایی خورده شده توسط موجود آبزی می‌شوند (Moriarty 1998)، همچنین با تحریک سیستم ایمنی ماهیان، میزان بازماندگی را تا حد زیادی در تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند (Tackert et al. 1989). در بررسی نتایج حاصل از آزمایش‌های تنش‌زا در مطالعه حاضر مشخص گردید که میزان مقاومت و درصد بازماندگی ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی در تنش‌های حاد دمایی (دمای بالا و پایین)، حاد شوری و pH (اسیدی و قلیایی) در مقابله با تیمار شاهد بهبود یافته و زمان بازماندگی ماهیان این تیمارهای ترکیبی افزایش یافته است. باکتری‌های پروبیوتیکی با ترشح ترکیبات متابولیکی مختلف و تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش عملکرد آن شده و پاسخ‌های ایمنی ماهی را مقابل محرک‌ها و تنش‌های محیطی جهت تحمل بهتر آن‌ها افزایش می‌دهند (Nikoskelainen et al. 2003).

دمای آب یک عامل زیست‌محیطی است که اثر بسیار مهمی را بر رشد، سلامتی و بقای ماهی دارد. دمای آب به طور قابل‌توجهی در فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل میزان تنفس، بازده تغذیه و جذب مواد غذایی، رشد و رفتار تولیدمثل مؤثر است (Alishahi and Mesbah 2012). زمانی که ماهی در معرض افزایش دما قرار می‌گیرد از یک طرف شدت سوخت و ساز بدن بالا رفته و نیاز اکسیژنی ماهی افزایش می‌یابد و از طرف دیگر با افزایش دمای آب، میزان اکسیژن محلول در آب کاهش می‌یابد، در واقع با قرار گرفتن ماهی در برابر تنش دمایی بالا، ماهی در معرض کاهش اکسیژن قرار می‌گیرد و احتمالاً مقاوم‌تر بودن ماهیان تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد، به دلیل وجود پروبیوتیک‌ها در جیره‌ی غذایی این ماهیان می‌باشد. زیرا پروبیوتیک‌ها با تحریک سیستم ایمنی میزبان موجب افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی گشته و درصد بازماندگی را بالا می‌برند (Nikoskelainen et al. 2003). بررسی نتایج تنش شوری ۳۵ ppt در آزمایش حاضر مشخص کرد که درصد بازماندگی ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی در برابر این تنش بیش‌تر از ماهیان تیمار شاهد می‌باشد. احتمالاً مکمل غذایی ترکیبی از طریق تقویت میکروفلور روده به سمت باکتری‌های مفید منجر به تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهیان تیمارهای آزمایشی در برابر تنش شوری گردیده است. مقاومت در برابر تنش شوری تحت تأثیر میزان شوری، عوامل محیطی، گونه، اندازه، سن و شرایط تغذیه‌ای می‌باشد (Liu et al. 2010). نتایج مشابهی در خصوص اثرات مثبت پروبیوتیک و پری‌بیوتیک (منفرد و ترکیبی) بر مقاومت در برابر تنش‌های محیطی بر روی گونه‌های فیل ماهی (Esmaeili et al. 2011, *Huso huso*)، ماهی شانک دریایی (Roberts 2001, *Sparus aurata*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Jafaryan 2006, *O. mykiss*) و تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*, Faramarzi 2011) گزارش گردیده است. در آزمایش تنش pH اسیدی، میزان مقاومت ماهیان تیمارهای سین‌بیوتیکی از تیمار شاهد بیش‌تر بود که این نتیجه را می‌توان عملکرد مطلوب مکمل غذایی ترکیبی در بالا بردن سطح ایمنی و مقاومت ماهیان تغذیه شده با این محصول در طول دوره‌ی آزمایش ارزیابی نمود (Mehrabi et al. 2011). در محیط اسیدی حلالیت فلزات سنگین مانند آهن و قرار گرفتن آن‌ها روی آبشش ماهی و به تبع آن کاهش تبادلات اکسیژنی به وقوع می‌پیوندد (Nafisi Bahabadi 2006) با هرگونه تغییر در شرایط محیطی مانند دما، شوری و pH اولین واکنش فیزیولوژیک آبزی جهت مقابله با شرایط ایجاد شده مصرف بیش‌تر انرژی و متعاقب آن بالا رفتن نیاز اکسیژنی است که از طریق هموگلوبین به خوبی این تغییرات مشهود است (Kazemi

et al. 2010) و با توجه به افزایش میزان هموگلوبین خون در تیمارهای سین‌بیوتیکی و در نتیجه افزایش حمل اکسیژن محلول در خون ماهیان این تیمارها نسبت به تیمار شاهد، می‌توان درصد بازماندگی بیش‌تر تیمارهای سین‌بیوتیکی را توجیه نمود. آمونیاک مهم‌ترین ماده‌ی دفعی حاصل از متابولیسم است. این ماده از طریق آبشش‌ها و کلیه به محیط آب دفع می‌شود. اگر محیط اسیدی باشد آمونیاک به یون آمونیوم بی‌خطر تبدیل می‌شود، اما اگر محیط قلیایی باشد آمونیاک در محیط آبی باقی می‌ماند و توانایی آبشش‌ها در دفع آمونیاک کاهش می‌یابد و به دنبال آن غلظت آمونیاک در خون ماهی بالا رفته و تبادل اکسیژنی نیز کاهش می‌یابد (Nafisi Bahabadi 2006). در تنش pH قلیایی، بین تیمارهای شاهد و سین‌بیوتیکی، با افزایش استفاده از ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک بر میزان مقاومت ماهیان این تیمارها بهبود قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد.

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایش حاضر، مقدار ۱/۵ تا ۲ گرم ترکیب پروبیوتیک *اینتروکوکوس فاسیوم* (5×10^{11} CFU/KG) و پری بیوتیک اینولین بر کیلوگرم جیره‌ی غذایی مناسب است. لذا این مقدار می‌تواند به عنوان محدوده‌ی مطلوب استفاده از این مکمل غذایی برای بهبود سطح ایمنی غیراختصاصی در جیره‌ی غذایی ماهی بنی (*M. sharpeyi*) پیشنهاد گردد.

منابع

Beit Sayah, Kh.; Chelemale Dezfolinezhad, M.; Mesbah, M. and Asgari Sari, E. (2012). Effect of different levels of vitamin C on blood factors in *Barbus Grus*. Journal of Veterinary Research, 4(14): 1-9.

Burr, G.; Gatlin, D. and Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. Journal of the World Aquaculture society, 36(4): 425-436.

Donaldson, E.M. (1981). Pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. Stress and fish. Academic Press, New York, Pp: 11-47.

Eaton, T.J. and Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus virulence* determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and environmental microbiology, 67(4): 1628-1635.

Ekanem, J.T.Y. and Usuf, O.K. (2008). Some biochemical and haematological effects of black seed (*Nigella sativa*) oil on Trypanosoma brucei-infected rats. African Journal of Biotechnology Research, 7(2): 153-157.

Esmaeili, M.; Jaefarian, H.; Akrami, R. and Porabbasali, M. (2011). Effectiveness of *Huso huso* extracted bacillus on resistance and biochemical factors of common carp larvae (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research, 2(8): 15-24.

Ahmadi, K.; Vosoghi, A.; Mirvaghefi, A.R.; Ataee Mehr, B. and Banaee, M. (2010). Effect of extraction of *Silybum mariamum* on some non-specific immunogenic factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Marine Biology, 2(7): 19-26.

Alishahi, M. and Mesbah, M. (2012). Effects of Viscum album and Nigella sativa extracts on survival rate, growth factors and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in gold fish *Carassius auratus*. Journal of Veterinary Research, 67(3): 285-290.

Andrews, C.; Exell, A. and Carrington, N. (2011). The manual of fish health: everything you need to know about aquarium fish, their environment and disease prevention. Interpet Publishing, P: 208.

Bahrami Babahydari, S.; Dorafshan, S.; Paykan-heyrati, F.; Mahboobi Soofiani, N. and Vahabi, M.R. (2013). Effect of dietary wood betony, *Stachys lavandulifolia vahl* extract on growth performance, some hematological and biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Fisheries Science, 14 (4): 805-817.

Banaee, M.; Mirvaghefi, A.R.; Rafiee, Gh. and Sorda, G.A. (2010). Effect of silymarin on blood biochemical factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources), 4: 271-286.

Fanouraki, E.; Divanach, P. and Pavlidis, M. (2007). Baseline values for acute and chronic stress indicator in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture, 265(1-9): 294-304.

Faramarzi, M.; Kiaalvandi, A. and Iranshahi, F. (2011). The effect of probiotics on growth performance and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of animal and veterinary advances, 10(18): 2408-2413.

Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C. (2000). Schalm's Veterinary Hematology. (5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins viruse. Philadelphia, USA, Pp: 1120-1124.

Floyd, R.F. (2009). Stress-its role in fish disease. Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida. Pp: 109-144.

Ghodratizadeh, S.; Ghodratizadeh, S.; Farhoudi, M. and Habibian, R. (2011). Effect of addition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in diet on selected hematological and biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Word journal of fish and marine sciences, 3: 96-99.

Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Kim, M.C.; Kim, J.S.; Han, Y.J. and Heo, M.S. (2009). Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts, Fish and Shellfish Immunology, 27: 508-515.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics, 96(2-3): 67-202.

Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Merrifield, D.L.; Amiri, B.M.; Yelghi, S. and Bastami, K.D. (2011). The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. Fish Physiology and Biochemistry, 37(1): 91-96.

Houston, A.H. (1990). Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyle PB (eds) Methods in fish biology. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, Pp: 273-335.

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

Jha, A.K.; Pal, A.K. and Sahu, P. (2007). Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, w-3 fatty acid and b-carotene in *Catla catla* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 23(5): 917-927.

Johnson, A.M.; Rohlfs, E.M. and Silvrman, L.M. (1999). Proteins. In: Burtis C.A., Ashwood E.R. Editors. Tiets textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Pp: 477-540.

Kazemi, R.; Pordehghani, M.; Yousefi, Y.; Yarmohammaddi, M. and Nasri, M. (2010). Physiology of aquatic circulatory system and applied hemodynamics. Bazargan Publishing House, Rasht, P: 194.

Klare, I.; Konstabel, C.; Badstübner, D.; Werner, G. and Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. International Journal of Food Microbiology, 88(2-3): 269-290.

Kökdil, G.; Tamer, L.; Ercan, B.; Çelik, M. and Atik, U. (2006). Effects of *Nigella orientalis* and *N. segetalis* fixed oils on blood biochemistry in rats. Phytotherapy Research, 20(1): 71-75.

Kosha, A.; Asgarian, F.; Chati, H.V. and Geli, V.S. (2006). Study of steroids bonded protein- (SBP) in white fish (*Rutilus frisii* kutum) with an emphasis on 17 beta estradiol. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 6(2): 92-104.

Kubilay, A. and Ulukoy, G. (2002). The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 26: 249-254.

Kumar, S.; Sahu, N.P.; Pal, A.K.; Choudhury, D.; Yengkokpam, S. and Mukherjee, S.C. (2005). Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. Fish & Shellfish Immunology, 19: 331-344.

Kunlee, Y. and salminen, S. (2009). Hand book of probiotics and prebiotics. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey Published simultaneously in Canada, Pp: 111-123.

Liu, K.F.; Chiu, C.H.; Shiu, Y.L. and Cheng, W. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish & Shellfish Immunology, 28(5-6): 837-844.

Lin, S.H.; Mao, S.H.; Guan, Y.; Luo, L.; Luo, L. and Pan, Y. (2012). Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). Aquaculture 342: 36-41.

Mehrabi, Z.; Firouzbakhsh, F. and Jafarpour, A. (2011). Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Journal of Animal physiology and Animal nutrition, 96(3): 474-481.

Merrifield, D.L.; Dimitroglou, A.; Foey, A.; Davies, S.J.; Baker R.T.M. and Bøgwald, J. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 302(1-2): 1-18.

Minabi, Kh.; Zakeri, M.; Mousavi, S.M. and Minabi, E. (2013). The effects of feeding frequency and water temperature on growth, nutrition and biochemical parameters of Beni. Iranian Veterinary Journal, 9(1): 85-94.

Moriarty, D.J.W. (1998). Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture pond. Aquaculture, 164(1-4): 351-8.

Morris, M.W. and Davey, F.R. (1996). Basic examination of blood. In: Henry JB (ed). Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19th edn. WB Saunders, Philadelphia, USA, Pp: 549-593.

Nafisi Bahabadi, M. (2006). A practical guide to rainbow trout culture. Hormozgan University Publications, Hormozgan, Pp: 22-31.

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*). Fish and Shellfish Immunology, 23(4): 892-896.

Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E.M. (2003). Immuneenhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish & Shell fish Immunology, 15(5): 443-452.

Roberts, R.J. (2001). Fish Pathology. Sounders, London, P: 472.

Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish immunology, 27(3): 440-445.

Tackaert, W.; Albei, P.; Leger, P. and Sorgeloos, P. (1989). Stress resistance as a criterion to evaluate quality of post larval shrimp reared under different feeding procedures. In: Proceeding, III Simposio Brasil erio sorbe Cultivo de Camaro, Vol. l.MCR Aquaculture; Jodo Pesoa; Brazil, Pp: 393-403.

Taras, D.; Vahjen, W. and Macha, M. (2006). Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. Journal of Animal Science, 84(3): 608-617.

Tatina, M.; Bahmani, M.; Soltani, M.; Abtani, B. and Gharibkhani, M. (2010). Effects of different levels of dietary vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of Sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Fisheries & Aquatic Science 5(1): 1-11.

Thrall, M.A. (2004). Veterinary haematology and clinical chemistry. Lippincott Williama and Wilkins, USA, Pp: 247-402.

Vazquez-Juarez, R.C.; Gomez-Chiarri, M.; Barrera-Saldaña, H.; Hernandez-Saavedra, N.; Dumas, S. and Ascencio, F. (2005). Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from (*Aeromonas veronii*). Fish & shellfish immunology, 19(2): 153-163.

Vulevic, J.; Rastall, R.A. and Gibson, G.R. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. FEMS Microbiology Letters, 236(1): 153-159.

Wang, Y.B.; Tian, Z.Q.; Yao, J.T. and Li, W.f. (2008). Effect of probiotics *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277(3): 203-207.

Yar-Ahmadi, P.; Moradi, N. and Ghyasvandi, N. (2014). The effect of dietary supplemented with Synbiotic (Biomin IMBO®) on growth performance, carcass composition, hematological and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758, Cyprinidae). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4(3): 2129-2139.

Ye, J.D.; Wang, K.; Li, F.D. and Sun, Y.Z. (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(4): 902-911.

Yousefian, M.; Sheikholeslami, M.; Amiri A. and Kor, D. (2010). Serum biochemical parameter of male, immature and female Persian sturgeon (*Acipencer persicus*). Astralian Journal Basic and Applied Research, 5: 476-481.

Zhang, Q.; Tan, B.; Mai, K.; Zhang, W.; Ma, H. and Ai, Q. (2011). Dietary administration of Bacillus (*B. licheniformis and B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Research, 42(7): 943-952.

Combinatory effects of dietary Inulin and *Entrococcus faecium* in Benni, *Mesopotamichthys sharpeyi* on some hematological parameters, Serum biochemical and resistance to environmental stress

Bajelan, B.[1]; Zakeri, M.[2]; Mousavi, S.M.[2]; Yavari, V.[2] and Rajab zadeh, E.[3]

Received: 02.11.2016 Accepted: 04.07.2017

Abstract

This study has been carried in order to determine the effect of dietary combinatory probiotic and prebiotic on some hematological parameters, serum biochemical and resistance to environmental stresses of Benni (*Mesopotamichthys sharpeyi*) juveniles. 600 fish with initial average weight of 3.83±0.2 g were stocked in 15 tanks. Five dietary treatments included treatment 1 (control) which was fed with basal commercial diet only and the other treatments 2 to 5 containing 0.5, 1, 1.5 and 2 g *Entrococcus faecium* (5×10^{11} CFU/KG) and Inulin per kg of diets, respectively. The experimental trail was carried out in triplicate for a period of 60 days. Experimental fish were fed (3% body wet weight) daily at 08:00, 13:00 and 18:00. The results of the present study demonstrated that the significantly increased the hematological parameters among the treatments. The hematocrit and white blood cells were increased with increasing by combinatory dietary levels. However, the red blood cells and hemoglobin were decreased. In addition, total protein and globulin indices significantly increased with increasing dietary levels. However, cholesterol and triglyceride levels of experimental fish decreased among treatments. The results of environmental stresses (thermal, salinity and pH stress) showed that resistance and survival rate of fish were significantly higher in the treatments with higher dietary probiotic and prebiotic than the control treatment. The present study revealed that the best results for *M. sharpeyi* juveniles were achieved at 1.5 g to 2 per kg dietary *Entrococcus faecium* (5×10^{11} CFU/KG) and Inulin based on improved of hematological parameters, serum biochemical composition and resistance against the environmental stresses.

Key words: *Mesopotamichthys sharpeyi*, *Entrococcus faecium*, Inulin, Environmental stress

1- MSc Graduated of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran
2- Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran
Corresponding Author: Zakeri, M., E-mail: Zakeri.mhd@gmail.com