مقایسه اثر جیره‌های حاوی پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)

کمال اینانلو[۱]، سهیل علی نژاد*[۲]، عسگر زحمتکش[۱]، باقر امینیان فتیده[۱]

*soheilalinezhad47@gmail.com

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۲- موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۸

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بر شاخص‌های خونی، ایمنی‌شناسی و رشد بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد. به این منظور تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با وزن (S.D ۱۴gr±۱/۴۴) در ۳ تیمار ذخیره‌سازی شدند. تیمار ۱: جیره تجاری حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* ۱/۵ g/10kg($10^{10}CFUg^{-1}$) و تیمار ۲: جیره تجاری حاوی پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* ۱/۵ g/10kg($10^{10}CFUg^{-1}$) و تیمار ۳ یا شاهد با استفاده از غذای تجاری بدون پروبیوتیک، به مدت ۶۰ روز مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش، تعداد ۱۵ ماهی از هر تیمار نمونه‌گیری و شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، درصد افزایش وزن، درصد نوتروفیل و مونوسیت، لایزوزیم و C_3 در تیمار ۱ به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ بود. مقادیر هماتوکریت، گلبول قرمز خون، هموگلوبین، MCV، MCH در تیمار ۲ به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. مقادیر MCHC و درصد لنفوسیت در تیمار ۳ بیشترین مقدار را نشان داد. مقادیر IGM و C_4 در بین تیمارها تفاوت معنی‌دار آماری نشان ندادند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از جیره حاوی پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* می‌تواند تاثیرات مثبتی بر فراسنجه‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی داشته باشد.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، پروبیوتیک، شاخص‌های خونی، ایمنی، رشد

*نویسنده مسئول

مقدمه

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفیدی هستند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم برای محافظت جانور میزبان در برابر باکتری‌های مضر عمل کرده و می‌توانند به طور مستقیم مکانیسم‌های دفاعی اولیه را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند (Wang, 2007). تحقیقات مختلفی تأثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها را بر رشد و مقاومت ایمنی کپور ماهیان بخصوص ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشان داده‌اند (Gopalakannan & Arul, 2011; Giri *et al.*, 2012; Weifen *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014; Mohapatra *et al.*, 2014;Wu *et al.*, 2015). همچنین در آزمایش‌های جداگانه، پروبیوتیک‌ها سبب بهبود میزان لایزوزیم، C_3، پروتئین کل سرم، آلبومین و گلوبولین و فعالیت فاگوسیتوزی گلبول‌های سفید خون در گونه‌های مختلف کپور شدند (Chi *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2013; Giri *et al.*, 2012).

باکتری *Lactobacillus acidophilus* از خانواده لاکتوباسیل‌ها می‌باشد. این گونه بی‌هوازی اجباری و دارای متابولیسم تخمیری است که از طریق تخمیر قندها تولید انرژی می‌کند و حداقل نیمی از فرآورده‌های آن اسید لاکتیک است. مصرف این باکتری در برخی آبزیان باعث بهبود رشد و تنظیم فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی شده است (باقری و فارسانی، ۱۳۹۵). باکتری *Pediococcus pentosaceus* باکتری گرم مثبت، غیر متحرک، فاقد هاگ، بی‌هوازی و به شکل کروی است. محصول نهایی باکتری *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* (ناشی از سوخت ساز بدن) اسید لاکتیک می‌باشد و بهمین جهت جزء باکتری‌های اسید لاکتیک طبقه بندی می‌شود. این باکتری دارای تاثیرات مثبت بر فاکتورهای رشد، فلور میکروبی روده، ترکیبات بدن و برخی شاخص‌های بیوشیمی، خون شناسی و ایمنی در تاس‌ماهی سیبری بوده است (مصلحی و همکاران، ۱۳۹۳).

در این تحقیق با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها و نقش آنها در افزایش تولید و سطح ایمنی ماهیان، اثرات دو پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* و *Pediococcus pentosaceus* بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

محل مطالعه و شرایط آزمایشی

در این آزمایش تعداد ۲۰۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۱/۱۱±۱۵ گرم به منظور سازگاری، به مدت یک هفته با جیره غذایی شاهد تا حد سیری تغذیه شدند. سپس تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی در ۹ مخزن فایبرگلاس (ظرفیت ۲۰۰۰ لیتر) به ۳ گروه (با ۳ تکرار) تفکیک شدند. در طول آزمایش متغیرهای کیفی آب اندازه‌گیری و ثبت شد. در طول پرورش دمای آب، اکسیژن محلول و pH به ترتیب۵/ ۲۴ - ۲۴ درجه سانتی گراد، ۷/۷ - ۵/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر و ۸/۹-۸/۰۱ بود. منبع تامین آب کانال سد سنگر بود که پس از آبگیری استخر ذخیره، از طریق پمپ دیگری، آب وارد مسیر لوله کشی شده به داخل مخازن منتقل شد. مخازن پس از شستشو و ضدعفونی به میزان ۱۰۰۰ لیتر آبگیری شدند، آب به صورت مداوم در جریان بود. مقدار ورودی آب هر یک از مخازن ۱۴-۷ لیتر در دقیقه بود. وزن و طول بچه ماهیان آزمایشی با ترازوی دقیق ۰/۱ گرم و تخته بیومتری با دقت ۱ میلی متر در دو مرحله اندازه گیری شد. مرحله اول پس از سازگاری بچه ماهیان و مرحله بعدی در پایان دوره انجام شد.

تیمارهای آزمایشی

تیمار ۱ با استفاده از جیره تجاری حاوی $g.\ 10kg^{-1}$ ($10^{10}CFU\ g^{-1}$) ۱/۵ پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* با کد PTCC1643 و تیمار ۲ با استفاده از جیره غذایی تجاری حاوی (10^10CFU g-1) g. 10kg-1 ۱/۵ پروبیوتیک *Pediococcus pentosaceus* با کد JF831149 و تیمار ۳ یا شاهد با استفاده از غذای تجاری بدون پروبیوتیک، به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. پروبیوتیک‌های استفاده شده با کد و تعداد کلنی مشخص

شده، از موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر تهیه شدند.
برای تغذیه بچه ماهیان از غذای پلت SFC با قطر ۲ میلی متر محصول کارخانه فرادانه، نمایندگی استان گیلان استفاده گردید. ترکیب شیمیایی خوراک بر اساس جدول مشخصات خوراک اکسترود ماهی کپور به شرح ذیل بود: پروتئین خام، ۴۱-۳۸٪، چربی خام، ۸-۴٪، فیبر، ۶-۳٪، خاکستر، ۱۱-۷٪، رطوبت، ۱۱-۵٪ و فسفر، ۱/۵-۱۱٪ بود. این خوراک بدون هیچ گونه ماده افزودنی از نوع پروبیوتیک، به صورت دستی و در ساعات ۸، ۱۲و ۱۶، تا حد سیری در اختیار بچه ماهیان قرار گرفت.

فراسنجه‌های مورد اندازه‌گیری

در پایان دوره آزمایش، تعداد ۱۵ ماهی از هر تیمار نمونهگیری و شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی اندازه‌گیری شد. پس از بی‌هوش نمودن ماهیان با گل میخک با دُوز ۲۵۰ ppm، خون‌گیری از سیاهرگ وریدی انتهای باله ماهیان انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر خون در سرنگ ۲ میلی‌لیتری هپارینه جهت بررسی‌های خون‌شناسی برداشت و در ظروف اپندورف نگهداری شد.
شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده شامل وزن اولیه، وزن نهایی، تغییرات افزایش وزن برحسب گرم و ضریب رشد ویژه برحسب درصد در روز بود. فاکتورهای خون‌شناسی شامل هماتوکریت (Rehŭlka, 2000)، میزان گلبول‌های سفید و میزان گلبول‌های قرمز (Blaxhall and Daisley, 1973)، مقدار هموگلوبین (Drabkin,1954)، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH)، میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) (Klinger *et al.*, 1996) تعیین شدند. فاکتورهای ایمنی خون شامل کمپلمان‌های C_3 و C_4 (Chi *et al.*, 2014)، IgM (Thomas, 1998) (کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون، تحت لیسانس بلژیک، Eurolyser: H912) و میزان فعالیت لایزوزیم (Giri *et al.*, 2012) (ELISA reader) بودند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون‌های آماری کلموگروف-اسمیرنوف (آزمون نرمال بودن الگوی پراکنش داده‌ها) و نیز آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون بررسی وجود تفاوت بین گروه شاهد و تیمارها استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد بچه ماهیان

بر اساس نتایج حاصل از بیومتری بچه ماهی‌های کپور (جدول ۱)، بین تیمارهای مورد بررسی از نظر وزن اولیه اختلاف معنی‌دار آماری با گروه شاهد وجود نداشت ($p>0.05$)، ولی وزن نهایی در پایان دوره پرورش اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داد ($p<0.05$). تغییرات وزن نهایی بچه ماهیان کپور در تیمار باکتری *لاکتوباسیلیوس اسیدوفیلوس* دارای نتیجه بهتری نسبت به سایر تیمارها بود، اما ضریب رشد ویژه تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت.

شاخص‌های خون‌شناسی

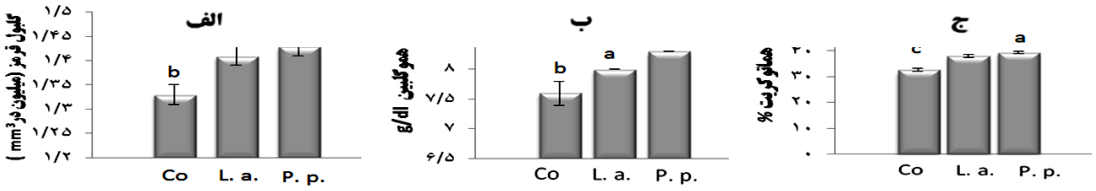
بر اساس نتایج بدست آمده (شکل ۱.الف) تعداد گلبول قرمز خون در گروه شاهد به شکل معنی‌داری کمتر از تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بود ($p<0.05$).
همچنین مقدار هموگلوبین در گروه شاهد نسبت به تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* کمتر بود (شکل ۱.ب، $p<0.05$). مقدار هماتوکریت نیز در هر سه تیمار به شکل معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بودند ($p<0.05$) بطوریکه تیمار *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* دارای بیشترین مقدار هماتوکریت بود (شکل ۱.ج).
مقدار MCV نیز در تیمارها متفاوت بود ($p<0.05$). در گروه شاهد کمترین مقدار و در تیمار پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بیشترین مقدار مشاهده شد (شکل۲.الف).

جدول ۱: تأثیر پروبیوتیک‌های (*L. a.*) *Lactobacillus acidophilus* و (*P. p.*) *Pediococcus pentosaceus* در مقایسه با تیمار شاهد(Co.) بر فراسنجه‌های رشد بچه ماهیان کپور معمولی

Table 1: Effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L. a.*) and *Pediococcus pentosaceus (P. p.)*, compared with control group on growth parameters of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*).

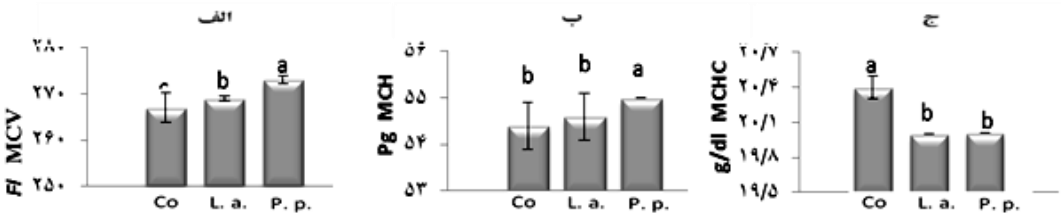
تیمارها	*Co.*	*L. a*	*P. p*
وزن اولیه (gr)	۱۴/۰۷ ±۰/۸۱	۱۴/۷۸ ± ۰/۶۶	۱۳/۲۷ ± ۰/۸۸
وزن نهایی (gr)	۷۷/۱۵ ± ۱/۶۲ ^{a}	۸۴/۲۳ ± ۲/۱۵ ^{b}	۷۷/۰۲ ± ۱/۲۳ ^{a}
تغییرات افزایش وزن (gr)	۶۸/۰۸ ± ۲/۲۴ ^{a}	۶۹/۵۵ ± ۲/۷۵ ^{c}	۶۴/۷۵ ± ۱/۳۱ ^{ab}
ضریب رشد ویژه (٪ در روز)	۲/۶۶ ± ۰/۱۲	۲/۷۲ ± ۰/۱۱	۲/۷۷ ± ۰/۰۹۹

حروف متفاوت در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشند ($p<0.05$).



شکل۱: تأثیر پروبیوتیک‌های (*L. a.*) *Lactobacillus acidophilus* و (*P. p.*) *Pediococcus pentosaceus* در مقایسه با تیمار شاهد (Co.) بر تعداد گلبول قرمز خون (الف)، مقدار هموگلوبین (ب) وهماتوکریت (ج) بچه ماهیان کپور معمولی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری‌اند ($p<0.05$).

Figure 1: Effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L. a.*) and *Pediococcus pentosaceus (P. p.)*, compared with control group on RBC (a), Hemoglobin content (b) and Hematocrit (c) of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).



شکل۲: تأثیر پروبیوتیک‌های (*L. a.*) *Lactobacillus acidophilus* و (*P. p.*) *Pediococcus pentosaceus* در مقایسه با تیمار شاهد (Co.) بر MCV: حجم یک گلبول قرمز (الف)، MCH: میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (ب) و MCHC: میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (ج) بچه ماهیان کپور معمولی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری‌اند ($p<0.05$).

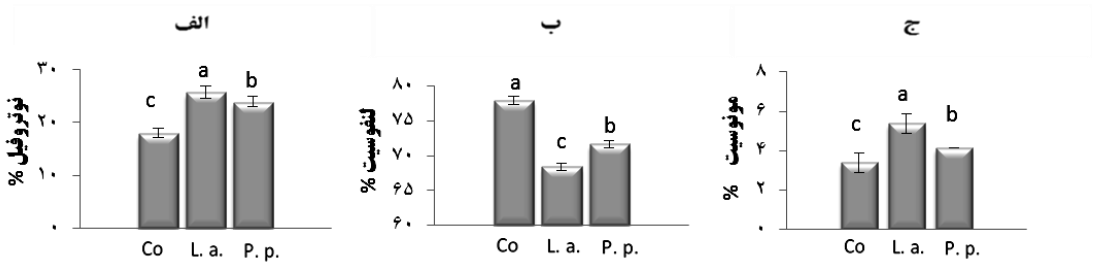
Figure 1: Effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L. a.*) and *Pediococcus pentosaceus(P. p.)*, compared with control group on MCV (a), MCH (b) and MCHC (c) of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).

مقدار MCH نیز در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بیشترین مقدار را نشان داد (شکل ۲.ب) و تفاوت معنی‌داری با دو تیمار دیگر داشت ($p<0.05$). بر اساس نتایج بدست آمده (شکل ۲.ج)، مقدار MCHC در تیمار شاهد به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک بود ($p<0.05$).

شاخص‌های ایمنی خون

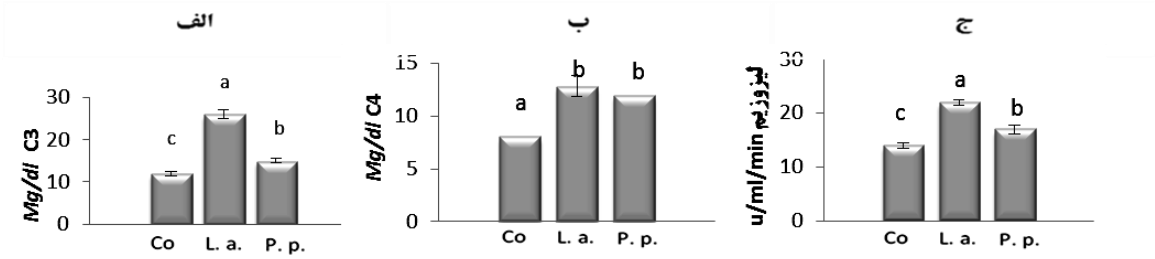
گلبول‌های سفید نیز تحت تأثیر تیمارهای خوراکی قرار گرفتند. مقدار گلبول‌های سفید در سه تیمار اختلاف معنی‌داری داشت، اما الگوی تغییرات در این سه نوع سلول متفاوت بود. درصد نوتروفیل و مونوسیت در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارای

بیشترین مقادیر نوتروفیل در خون بود ($p<0.05$، شکل ۳.الف و ج). اما مقدار لنفوسیت در تیمار شاهد، بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($p<0.05$، شکل ۳. ب).
مقدار C_3 و لایزوزیم در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به شکل معنی‌داری از دو تیمار دیگر بیشتر بود ($p<0.05$، شکل ۴. الف و ج). افزایش معنی‌داری نیز در میزان C_4 در تیمارها با گروه شاهد مشاهده شد. اما بین دو تیمار پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p<0.05$، شکل ۴. ب). مقدار IgM در گروه تیمار ۱ و ۲ بیشتر از گروه شاهد بود، اما تفاوت‌های مشاهده شده، معنی‌دار نبود ($p>0.05$).



شکل ۳: تأثیر پروبیوتیک‌های (*L. a.*) *Lactobacillus acidophilus* و (*P. p.*) *Pediococcus pentosaceus* در مقایسه با تیمار شاهد (Co.) بر درصد نوتروفیل (الف)، لنفوسیت (ب) و مونوسیت (ج) بچه ماهیان کپور معمولی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری‌اند ($p<0.05$).

Figure 3: Effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L. a.*) and *Pediococcus pentosaceus (P. p.)*, compared with control group on neutrophils (a), Lymphocyte (b) and monocytes (c) of juvenile common carp *(Cyprinus carpio)*. Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).



شکل ۴: تأثیر پروبیوتیک‌های (*L. a.*) *Lactobacillus acidophilus* و (*P. p.*) *Pediococcus pentosaceus* در مقایسه با تیمار شاهد (Co.) بر C_3 (الف)، C_4 (ب) و لایزوزیم (ج) بچه ماهیان کپور معمولی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری‌اند ($p<0.05$).

Figure 4: Effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L. a.*) and *Pediococcus pentosaceus (P. p.)*, compared with control group on C3 (a), C4 (b) and Lysozyme (c) of juvenile common carp *(Cyprinus carpio)*. Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).

بحث

در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها به دلیل تأثیر مثبت بر تعادل میکروبی روده، هضم و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش و بهره‌وری بیشتر از مواد غذایی رواج یافته است که حاصل آن کاهش هزینه و افزایش درآمد در مراکز آبزی‌پروری بوده است (چوبکار و همکاران، ۱۳۹۷؛ کاهکش و رومیانی، ۱۳۹۶؛ Chi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های این تحقیق نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای رشد و نیز تعداد زیادی از

فاکتورهای خون‌شناسی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی داشت.

شاخص‌های رشد بچه ماهیان

در تحقیق حاضر، هر دو پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد بچه ماهی کپور معمولی داشتند. اما تأثیر باکتری *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بر این شاخص‌ها کم‌تر از پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود. در تحقیقات تیموریان و همکاران (۱۳۹۵)، نیز تأثیر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* روی شاخص‌های رشد و بهبود فراسنجه‌های رشد ماهی کویی گزارش‌شده است. بر اساس نتایج تحقیق مصلحی و همکاران (۱۳۹۳)، نیز استفاده از پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* باعث بهبود معنی‌داری در شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی، نرخ کارایی پروتئین، رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن تاس ماهی سیبری گردید. باعثی و همکاران (۱۳۹۵) و Noh و همکاران (۱۹۹۴) اثر مثبت لاکتوباسیلوس‌ها و استرپتوکوکوس‌های پروبیوتیکی تجاری را بر فراسنجه‌های رشد، بقاء و شاخص‌های تغذیه‌ای ماهی کپور معمولی گزارش نمودند.

تحقیقات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند با افزایش اشتها، بهبود سطح تغذیه، تولید ویتامین ها و ترکیبات سم‌زدا در جیره، باعث افزایش رشد شوند (Irianto & Austin, 2002). برخی پروبیوتیک‌ها دارای آنزیم‌های خارج سلولی از جمله آمیلاز، لیپاز و پروتئاز بوده و برخی از اثرات خود بر شاخص‌های رشد ماهیان را از طریق تاثیر موضعی این آنزیم‌ها در دستگاه گوارش میزبان القاء می‌کنند (Bairagi *et al.*, 2002). همچنین در تحقیقاتی که بر لاروهای آبزیان انجام شده است، پروبیوتیک‌ها از طریق تحریک اشتها یا با افزایش متابولیسم میکروبی، سبب ارتقاء سطح تغذیه توسط میزبان شده‌اند. این باکتری‌ها احتمالاً در میزبان‌های بالغ نیز توانایی ایجاد چنین اثری را دارند (Iriantoand Austin, 2002).

شاخص‌های خون‌شناسی

افزایش سطح فاکتورهای خون‌شناسی می‌تواند به عنوان شاخصی جهت بهبود سیستم ایمنی و توان زنده‌مانی ماهی کپور معمولی به دنبال تغذیه با جیره حاوی پروبیوتیک باشد (Talas & Gulhan, 2009). در مطالعه حاضر دیده شد که تعداد گلبول قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، مقدار حجم یک گلبول قرمز (MCV) و میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) در بچه ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک *اسیدوفیلوس* و *پنتوساسئوس*، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است. در بین دو تیمار، *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* تأثیر بیشتری داشت. میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC)، در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار پروبیوتیک بود.

در یک تحقیق اثر مخلوط دو پروبیوتیک تجاری *B. subtilis*و *B. licheniformis* بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج اثر مثبت این پروبیوتیک‌ها را بر غلظت هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گولبول‌های سفید و قرمز و سطح لایزوزیم نشان داد (خالقی و همکاران، ۱۳۹۷). در تحقیق باقری و فارسانی (۱۳۹۵) بر ماهی سورم طلایی *Heros severus*، جیره حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارای سطح بیشتری از میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز را نشان داد. افزایش غلظت گلبول قرمز، باعث بالا رفتن قابلیت جذب اکسیژن از آبشش می‌شود که به دنبال آن افزایش انتشار اکسیژن در بافت‌ها را شاهد خواهیم بود (حسینی و همکاران،۱۳۹۳). میزان کمتر هموگلوبین و به دنبال آن کاهش ظرفیت حمل اکسیژن، ممکن است منجر به کاهش سطح اکسیژن خون در ماهیان گروه شاهد شد. در نتیجه، احتمالا این گروه توانایی محدودتری در تأمین اکسیژن برای بافت‌ها در شرایط تنش داشته باشند.

شاخص‌های ایمنی

اولین سد دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا گلبول‌های سفید خون هستند. نسبت گلبول‌های سفید خون نشان‌دهنده

میزان تأثیر و نحوه عملکرد سلول‌ها در سیستم ایمنی است. در این پژوهش سلول‌های ایمنی تحت تأثیر تیمار پروبیوتیک قرار گرفتند. درصد مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در تیمارهای پروبیوتیک نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود.

به طور کلی، لنفوسیت‌ها تاثیر بسزایی در سیستم ایمنی غیر اختصاصی دارند. در تعداد زیادی از مطالعات انجام شده، پروبیوتیک‌ها سبب افزایش درصد لنفوسیت‌ها شده‌اند (Nayak, 2010). در برخی تحقیقات دیگر مانند نتایج این تحقیق، استفاده از پروبیوتیک‌ها سبب کاهش درصد لنفوسیت‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان شده (اسدی خمامی و همکاران، ۱۳۹۶، شیخ‌ویسی و همکاران، ۱۳۹۶) و تاثیر معنی‌داری بر این نوع گلبول سفید نداشته‌اند (Merrifield *et al.*, 2009). در تحقیق حاضر، نتایج در خصوص کاهش میزان لنفوسیت‌ها با بسیاری از تحقیقات متفاوت بود و برای تحلیل این نتایج، نیاز به مطالعات ایمونولوژیک دقیق‌تری با استفاده از در معرض قرارگیری ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا احساس می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان C_3 در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* دارای بیشترین مقدار بود. این نتیجه بیانگر تأثیر نسبی و مثبت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر فعالیت کمپلمان‌های کپور معمولی است. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده تأثیر مثبت پروبیوتیک‌های مورداستفاده، بر مقادیر لایزوزیم بود. درعین‌حال مقدار این متغیر در تیمار تغذیه‌شده به پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و تغذیه شده با پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بود. تأثیر کم‌تر پروبیوتیک *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* بر افزایش لایزوزیم هومورال در تحقیق مصلحی و همکاران (۱۳۹۳) نیز گزارش شده است. لایزوزیم در گلبول‌های سفید تولید می‌شود و کم‌تر تولید شدن این عامل دفاعی در تیمار مورد تغذیه با *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* می‌تواند به دلیل تأثیر تحریکی کم‌تر این پروبیوتیک بر سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی باشد. در دو تحقیق جداگانه که اثر مخلوط پروبیوتیک‌های مخلوط بر شاخص‌های ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی و کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*) بررسی شد، علاوه بر تاثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های ایمنی و مقاومت ماهی‌ها در برابر بیماری‌ها، بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی نیز افزایش یافت (Chi *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2015).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که جیره غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها می‌تواند یکی از راهکارهای موثر برای حفظ سلامت آبزیان پرورشی و افزایش مقاومت آنها به استرس و عوامل بیماری‌زا از طریق بهبود عملکرد ایمنی میزبان باشد. این مطالعه نشان داد که استفاده از جیره حاوی پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوساسئوس* می‌تواند دارای تاثیرات مثبتی بر فراسنجه‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی ماهی کپور معمولی باشد و طبق نتایج به دست آمده، تأثیر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر از پروبیوتیک دیگر است.

منابع

اسدی خمامی، س.، مورکی، ن. و ولیپور، ع.، ۱۳۹۶. تأثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی سیم *Abramis brama orientalis* . *علوم و فنون شیلات*، ۶ (۱) :۱-۱۲.

باعثی، ف.، آبرومند، ع.، ضیایی نژاد، س. و جواهری بابلی، م.، ۱۳۹۵. تأثیر لاکتوباسیل‌های پروبیوتیکی تجاری بر پارامترهای رشد، بقاء و شاخص‌های تغذیه‌ای ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریه توسعه آبزی‌پروری*، ۱۰ (۴):۳۹-۴۹.

باقری، ط. و فارسانی، ح.، ۱۳۹۵. اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه، خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی سورم طلایی. *پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی*، ۴(۲): ۹۵-۱۰۵.

تیموریان، ب. س.، شعیبی عمرانی، ب. و شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۵. تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس *Lactobacillus acidophilus* بر شاخص‌های رشد ماهی کویی. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

چوبکار ن.، کاکولکی ش.، صحرایی ف.، آقاجانی ع.، رضایی منش م. و محمدی ف.، ۱۳۹۷. بررسی تاثیر غذای غنی شده با پروبیوتیک بر فراسنجه های رشد ماهی پرورشی قزل‌آلای رنگین کمان. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۷ (۵): ۱۱۵-۱۲۴. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118089

حسینی، ع.، اورجی، ح.، یگانه، س. و شهابی، ح.، ۱۳۹۳. تأثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی روی رشد، فاکتورهای خونی و سرمی در ماهی آزاد دریای خزر. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲: ۳۵-۴۵. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691

خالقی، م.، سلطانی، م. و حسینی شکرابی، پ.، ۱۳۹۷. اثر افزودن مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (دی پرو آکوا) به جیره غذایی بر برخی شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *زیست شناسی دریا*، ۱۰ (۲) :۱۱-۲۰.

شیخ ویسی، ر.، باقری، ط.، سنچولی، ح. و هدایتی، س. ع. ا.، ۱۳۹۶ . اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *Lactobacillus* casei و نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد و ترکیب لاشه بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریه علمی پژوهشی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان*، ۵(۴): ۸۲-۹۳. DOI: 10.22124/JAPB.2018.6377.1122

کاهکش م. و رومیانی ل.، ۱۳۹۶. تاثیر خوراکی لاکتوباسیلوس کازئی و سطوح مختلف ایمونوژن بر عملکرد فاکتورهای ایمنی و خونی کپور معمولی (Cyprinus carpio). *مجله علمی شیلات ایران*، p۲(۶): ۱۳۹-۱۵۰. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.115841

مصلحی، ف.، ستاری، م.، خوش‌خلق، م.، شناور ماسوله، ع. و عباسعلی‌زاده، ع.، ۱۳۹۳. اثر پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس (*Pediococcus pentosaceus*) بر عوامل رشد و ایمنی تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*). *علوم و فنون شیلات*، ۳ (۴): ۸۱-۹۲.

Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K. and Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10: 109–121. DOI: 10.1023/A:1021355406412

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, (5): 771-781. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x

Chi, C., Jiang, B., Yu, X.B., Liu, T.Q., Xia, L. and Wang, G.X., 2014. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 9–18. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.10.003

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S. and Kamilya, D., 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35: 1547–1553. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.08.022

Drabkin, D.L.,1945. Crystallographic and optical properties of human Hemoglobin-a proposal for the standardation of Hemoglobin. *American Journal of the Medical Sciences*, 2: 268-270.

Giri, S.S., Sen, S.S. and Sukumaran, V., 2012. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 1135–1140. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.03.019

Gopalakannan, A. and Arul, V., 2011. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp. *Aquaculture International*, 19(5):973-985. DOI: 10.1007/s10499-011-9415-2

Gupta, A., Gupta, P. and Dhawan, A., 2014. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 41: 113–119. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.08.023

Irianto, A. and Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Diseases*, 25: 333-342. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00375.x

Klinger, R.C., Blazer, V.S. and Echevarria, C., 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 147(3-4), 225-233. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01410-X

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacalture Nutrition*,10: 1365-2095. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., PaniPrasad, K. and Mohanta, K.N., 2014. Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of Labeo rohita fingerlings reared at higher water temperatures. *PLoS ONE*, 9(6): e100929. DOI: 10.1371/journal.pone.0100929

Nayak, S. K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 2-14. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.02.017

Noh, S.H.; Han, K.; Won, T.H. and Choi, Y.J., 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on growth performance of carp. *Korean Journal of Animal Science*, 36: 480-486.

Rehůlka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 190: 27-47. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00383-5

Talas, Z. S. and Gulhan, M. F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1994-1998. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.04.011

Thomas, L., 1998. Clinical laboratory diagnostics: Use and assessment of clinical

laboratory results. TH-Books, Verlagsgesellschaft.

Wang, Y. B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269: 259-264. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.035

Weifen, L., Xiaoping, Z.,Wenhui, S., Bin, D., Quan, L., Luoqin, F. and Dongyou, Y., 2012. Effects of Bacillus preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1585–1592. DOI: 10.1007/s10695-012-9652-y

Wu, Z.Q., Jiang, C., Ling, F. and Wang, G.X., 2015. Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate immunity and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellu*s). *Aquaculture*, 438: 105–114. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.041

Comparison of diets containing *Lactobacilus acidophilus* and *Pediococcus pentosaceus* on growth, hematological and immunological characteristics in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)

Inanloo K.[1]; Alinezhad S.[*2]; Zahmatkesh A.[1]; Aminian Fatideh B.[1]

[*]soheilalinezhad47@gmail.com

1-Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran.

2-Agricultural Training and Extension Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus pentosaceus* on hematological, immunological and growth parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). 180 carp weighted 14±1.44 g were distributed in three treatments. Treatment 1: commercial diets with *Lactobacilus acidophilus* 1.5*g/10Kg* (10^{10}CFUg-1), treatment 2: *Pediococcus pentosaceus* 1.5*g/10Kg* (*10^{10}CFUg-1*) and treatment 3: commercial diets without probiotic diet were fed for 60 days. At the end of the experiment, 15 fish from each treatment were collected, hematological, immunological and growth parameters were measured. Based on the results, weight gain, neutrophil and monocyte percentages, lysozyme activity and C3 content in treatments 2 and 3 were significantly higher than control. Hematocrit, RBC, hemoglobin, MCV, MCH in treatment 2 were significantly higher than other treatments. MCHC and lymphocyte percentage showed the highest values in treatment 3. There was no significant difference between IgM and C4 levels between treatments. The results of this study showed that the use of *L. acidophilus* and *P. pentosaceus* probiotics have positive effects on the growth parameters, hematological and immunological parameters of juvenile common carp.

Keywords: Common carp, Probiotic, Hematological, Immunological, Growth parameters

[*]Corresponding author