تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* بر برخی شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم در بچه ماهی کپور معمولی پرورشی (*Cyprinus carpio*)

دل آرا سپهرفر[۱]، کوروش سروی مغانلو[۱*]، سیدحسین حسینی‌فر[۲]، حامد کلنگی میاندره[۲]

* k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۱-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* جیره غذایی بر شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی سرم در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام گرفت. بعد از ۲ هفته سازگاری بچه ماهیان با میانگین وزنی ۰/۶۹±۱۹/۰۶ گرم با شرایط آزمایشگاه، تعداد ۱۸۰ قطعه در ۱۲ تانک فایبرگلاس با تراکم ۱۵ قطعه در هر تانک توزیع گردید. سپس در قالب طرح کاملاً تصادفی به مدت ۲ ماه با ۴ جیره آزمایشی شامل جیره تجاری (گروه شاهد) و به ترتیب غذای تجاری مکمل شده به *P. acidilactici* به میزان $۰/۹\times۱۰^{۷}$ CFU/g، غذای حاوی *Agaricus bisporus* به میزان ۱۰ گرم بر کیلوگرم و غذای تجاری حاوی ترکیبی از *P. acidilactici* به میزان $۰/۹\times۱۰^{۷}$ CFU/g و پودر قارچ به مقدار ۱۰ گرم بر کیلوگرم پرورش داده شدند. نتایج حاصل در پایان دوره آزمایش نشان داد که اختلاف معنی داری در تعداد گلبول قرمز (RBC) وجود ندارد. بالاترین میزان هموگلوبین (۰/۳۷±۸/۱۵گرم در دسی لیتر)، MCV،۲۳/۷۷±۲۲۳/۶۳ (فمتولیتر)، MCH، ۵/۳۱±۵۶/۲۱ (پیکوگرم) و کمترین تعداد گلبول‌های سفید خون به مقدار ۱/۰۰±۹/۷۳ (10^{3} cell/ml×) در گروه سین بیوتیک مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، هماتوکریت ۱/۶۹±۳۲/۴۳ (درصد) و MCHC، ۱/۰۶±۲۵/۱۷ (درصد) نسبت به گروه شاهد، در تیمار سین بیوتیک افزایش نسبی نشان دادند ($p>۰/۰۵$). اختلاف معنی داری در کل ایمونوگلوبولین، فعالیت لیزوزیم و ACH_{50} در گروه های آزمایشی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). براساس نتایج بدست آمده، جیره غذایی حاوی $۰/۹\times۱۰^{۷}$ CFU/gپروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک موجب بهبود برخی از شاخص های خونی در کپور معمولی گردید.

کلمات کلیدی: شاخص‌های خونی، ایمنی غیراختصاصی سرم، کپور معمولی

* نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

مقدمه

خون حساس ترین بافت بدن به تغییرات ایجاد شده در موجود زنده است و شناخت شاخص های خونی برای شناسایی بیماری‌ها و تعیین وضعیت بهداشتی آبزیان الزامی می باشد (جمیلی و همکاران، ۱۳۷۸). در صنعت تکثیر و پرورش آبزیان، مطالعات خون شناسی و ایمنی برای حصول افزایش امنیت غذایی و کاهش هزینه های اقتصادی تولید ضروری است. استرس وارده از تغییرات فیزیولوژیکی می تواند بر پارامترهای خونی مؤثر واقع گردد (Martinez-Alvarez *et al.*, 2002). ماهیان به دلیل خونسرد بودن به شدت به محیط خود وابسته هستند. شرایط محیطی می تواند بر فیزیولوژی بدن آنها تاثیر بگذارد و می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات فاکتورهای خونی، پاسخ یک گونه مشخص ماهی به تغییرات محیطی در یک زمان خاص می‌باشد. با این وجود هنوز اثرات پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها در بسیاری از جنبه های فیزیولوژیکی و شاخص های خونی ماهی مشخص نشده است و مستلزم مطالعات بیشتر است. امروزه در صنعت آبزی پروری برای بهبود سلامت و افزایش مقاومت آبزیان در برابر بیماری ها فعالیت های بسیاری انجام شده که متداول ترین آن استفاده از مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها است. استفاده از این مکمل‌های غذایی منجر به کاهش مصرف آنتی بیوتیک ها گردیده و خود به عنوان محرک رشد و ایمنی مطرح هستند (Merrifield *et al.*, 2010).

پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* یک باکتری غیربیماری زا محسوب می‌شود که با اتصال به دیواره روده با باکتری های بیماری زا رقابت می کند و به عنوان یک میکروارگانیسم زنده می تواند سبب بهبود وضعیت سلامت میزبان شود و با تحریک سیستم ایمنی میزبان مانع از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش شوند (Gatesoup, 1999). این مکمل غذایی موجب تعادل جمعیت فلور باکتریایی روده شده و همچنین موجب تحریک پاسخ ایمنی غیر اختصاصی می‌شود (Ferguson *et al.*, 2010). به طور کلی اضافه کردن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهی باعث افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی و تحریک اشتها (Kruger, 1994)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساختن ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش رشد، بهبود سطوح غذا (Merrifield *et al.*, 2010) و همچنین افزایش کیفیت آب و افزایش بقای موجود می‌شوند (Panigrahi *et al.*, 2007). باکتری‌های ساکن روده با تخمیر انتخابی پربیوتیک‌ها موادی ترشح می‌کنند که سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند و بدین ترتیب سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردند (Firouzbakhsh *et al.*, 2011).

پودر قارچ به عنوان یک پریبیوتیک، کربوهیدرات غیر قابل هضمی است که به علت دارا بودن بتا گلوکان منجر به افزایش رشد باکتری های اسید لاکتیک، بهبود وضعیت سلامت و ایمنی میزبان می شود (Gibson *et al.*, 2004). بتاگلوکان ها نقش مهمی در فعال شدن ایمنی ذاتی و اکتسابی آبزیان دارند و با تحریک ایمنی ذاتی نه تنها منجر به بهبود روند عملکرد سیستم ایمنی شده، بلکه مانع عملکرد میکروارگانیسم های مضر هم می شوند (Sakai, 1999). بتاگلوکان موجود در قارچ می تواند با اتصال به گیرنده های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها و سایر سایر سلول های خونی منجر به فعال شدن آنها و در نتیجه حفظ و تقویت سیستم ایمنی گردد (Herre *et al.*, 2004).

به رغم مطالعات انجام شده تاکنون گزارشی در زمینه اثر سین‌بیوتیکی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودرقارچ *Agaricus bisporu* روی شاخص های خونی و پاسخ ایمنی در بچه ماهیان کپور منتشر نشده است. به همین دلیل هدف از این تحقیق، ارزیابی به کارگیری اثرات مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *P. acidilactic* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* برشاخص های خونی و پاسخ ایمنی در بچه ماهیان کپور معمولی پرورشی بود.

مواد و روش‌کار

این پژوهش به مدت ۶۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. بچه ماهیان کپور با میانگین وزنی ۰/۶۹±۱۹/۰۶گرم پس از یک دوره آداپتاسیون، به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ تانک فایبرگلاس یک متر مکعب نگهداری شدند. هر یک از مخازن با ۴۰۰ لیتر آب تازه پر شد و روزانه ۷۰ درصد آب از طریق برداشت ضایعات باقی مانده در کف تعویض می شد. پارامترهای کیفی آب مانند درجه حرارت و pH به

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

صورت روزانه و میزان اکسیژن محلول هر هفته یک بار اندازه گیری گردید.

جدول ۱: میانگین پارامترهای کیفی آب در طول دوره تحقیق
Table 1: Water quality parameters during the study period

پارامتر	مقدار
اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)	۶/۷±۰/۳۰
درجه حرارت (سانتی گراد)	۲۳±۱۰
pH	۷/۸±۰/۲۰

نحوه آماده سازی جیره‌های غذایی: برای آزمایش از غذای معمولی تجاری ماهی کپور (فرادانه) استفاده شد (ترکیب جیره در جدول ۲ نشان داده شده است). برای تیمارهای آزمایش، پروبیوتیک *P. acidilactici* و پربیوتیک پودر قارچ ابتدا توزین شد و سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری کپور اسپری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵). سپس در مجاورت هوا خشک شده و در زیپ کیپ پلاستیکی در یخچال نگهداری شد.

جدول ۲: ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورد استفاده
Table 2: Dietary formulation and proximate composition of the basal diet

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد اجزاء جیره (٪)	۳۵-۳۸	۴-۸	۴-۷	۷-۱۱	۵-۱۱	۱-۱/۵

تیمار اول (شاهد) فقط با غذای تجاری و مابقی تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به پروبیوتیک *P. acidilactici* و پربیوتیک پودر قارچ به ترتیب شامل تیمار دوم ($0/9\times10^{7}$ CFU/g پروبیوتیک)، تیمار سوم (۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک) و تیمار چهارم ($0/9\times10^{7}$ CFU/g پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک) تغذیه شدند. غذای مورد نیاز هر تانک با توجه به نتایج بدست آمده از زیست سنجی هر تانک پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. بچه ماهیان روزانه در ۳ وعده غذادهی شدند (ساعت ۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر)، میزان غذادهی ۳ درصد وزن بدن و کل دوره آزمایش ۶۰ روز به طول انجامید (جافرنوده، ۱۳۹۵).

نمونه برداری: قبل از خونگیری، تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع شد. به منظور ارزیابی فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی در انتهای دوره آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ عدد بچه ماهی کپور معمولی (۹ نمونه برای هر تیمار) به ظاهر سالم به صورت تصادفی انتخاب و در داخل محلول پودر گل میخک (غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر آب) قرار داده شد. پس از بیهوشی با استفاده از سرنگ ۲ml هپارینه و از طریق رگ ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی خونگیری به عمل آمد. نمونه خون به دو قسمت تقسیم شد و به ترتیب در لوله‌های هپارینه و غیر هپارینه جهت بررسی شاخص‌های سلولی (CBC) و شاخص‌های بیوشیمیایی خون به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه های خون موجود در لوله های غیر هپارینه، پس از تشکیل لخته به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۳۰۰ g سانتریفیوژ شدند و پس از جدا شدن سرم، نمونه های سرم با استفاده از سمپلر به تیوپ های جداگانه که از قبل علامت گذاری شده بودند، انتقال یافتند و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس برای اندازه گیری آنزیم های سرمی مورد استفاده قرار گرفتند (خانی و همکاران، ۱۳۹۴). شاخصهای خونی شامل تعداد گلبولهای قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبولهای سفید، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) طبق معادلات استاندارد اندازه گیری شدند (جافرنوده، ۱۳۹۵).

(MCV)حجم متوسط گلبولی (fl)

$$MCV(fl) = \frac{PCV \times 10}{RBC}$$

(MCH)هموگلوبین متوسط گلبولی (pg)

$$MCH(pg) = \frac{Hb \times 10}{RBC}$$

(MCHC)غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز(٪)

$$MCHC\ (\%) = \frac{Hb \times 100}{PCV}$$

(RBC): تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون،(Hb): هموگلوبین و (PCV): هماتوکریت

تعداد گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار مورد سنجش قرار گرفتند. هماتوکریت با استفاده از دستگاه میکرو سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

دور g ۲۳۰۰ و با خط کش مخصوص محاسبه گردید. هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین با استفاده از کیت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین محصول شرکت پارس آزمون با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Subramanian *et al.*, 2008). برای سنجش این آنزیم از باکتری میکروکوکوس لوتئوس (ATCC ۴۶۹۸) به عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه میکروکوکوس لوتئوس در بافر فسفات پتاسیم (pH ۷)، ۰/۰۴ مولار حل شده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات سدیم) در طول موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به کووت اضافه شد و بعد از ۵-۴ دقیقه به دمای تعادل رسید. سپس به کووت شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر بافر و به کووت نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه سرم خون اضافه شد. محتویات کووت به خوبی مخلوط گردید و کاهش جذب به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان گردید.

تعیین فعالیت کمپلمان سرم نیز براساس همولیز گلبولهای قرمز خرگوش (RaRBC) و به کمک روش Whaley و North (۱۹۹۷)، Boesen و همکاران (۱۹۹۹) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) اندازه گیری شد. منحنی لیز با کمک کاغذ شطرنجی (Log-Log Graph) رسم شد. فعالیت کمپلمان نمونه عبارت است از حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود و از رابطه زیر بدست می آید؛

$$ACH50^{1}\ (U/ml) = k \times (\text{فاکتور رقت}) \times ۰/۵$$

در این رابطه k مقداری از سرم برحسب میلی‌لیتر است که سبب ۵۰ درصد همولیز میشود و ۰/۵ عدد ثابت است. فاکتور رقت در این تست ۰/۰۱ میباشد چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از ثبت داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن ، از طریق نرم-افزار SPSS۱۶ آنالیز آماری انجام شد و با نرم افزار Excel ۲۰۱۳ شکل‌ها رسم گردیدند. تمام داده‌ها براساس میانگین±انحراف معیار، ارائه شدند.

نتایج

تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک و پودر قارچ روی برخی شاخص‌های خونی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل هیچگونه اختلاف معنی داری در تعداد گلبول قرمز (RBC) تیمارها نسبت به گروه شاهد نشان نداد ($p>۰/۰۵$). در مورد تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، تعداد گلبول‌ها در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پربیوتیک بیشتر از سایر گروه‌های مورد بررسی می باشد و کمترین تعداد گلبول‌ها در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سین‌بیوتیک دیده شد که این دو گروه دارای اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک و شاهد بودند. میزان هماتوکریت در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش جزئی داشت، با این حال میزان افزایش اختلاف معنی داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$). مقدار هموگلوبین در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سین‌بیوتیک به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت و در تیمار شاهد به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت اما بین تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک و پربیوتیک اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). بیشترین میزان MCV در نمونه خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سین‌بیوتیک مشاهده شد که دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود ($p<۰/۰۵$) که این شاخص به طور معنی داری در گروه شاهد کاهش نشان داد ($p<۰/۰۵$) اما بین تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک و پربیوتیک اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). افزایش معنی داری در میزان MCH در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سین بیوتیک مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) و میزان متوسط هموگلوبین گلبول قرمز در این تیمار بیشتر از سایر گروه های مورد بررسی بود. بعد از آن ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک بیشترین میزان MCH را در نمونه خون خود داشتند که این دو گروه دارای اختلاف معنی دار بودند ($p<۰/۰۵$)، میزان این شاخص در گروه شاهد نیز به طور معنی داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). در مورد شاخص MCHC با وجود افزایش جزئی در تمامی

[1] Alternative pathway total hemolytic complement assay

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

تیمارها نسبت به گروه شاهد، اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

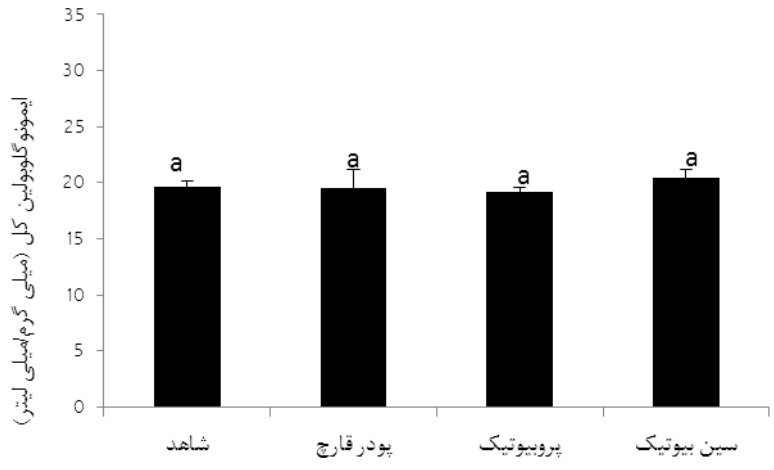
جدول ۳: مقایسه شاخص های خونی بچه ماهیان کپور تغذیه شده با پروبیوتیک *P. acidilactici* (۰/۹×۱۰^۷ CFU/g) و پودر قارچ *Agaricus bisporus* (۱۰ گرم بر کیلوگرم).

Table 3: Blood indices of common carp fed with *Pediococcus acidilactici* ($0/9 \times 10^7$ CFU / g) and *Agaricus bisporus* (10 g / kg).

شاخص های خونی	شاهد	پروبیوتیک	پربیوتیک	سین بیوتیک
گلبولهای قرمز($\times 10^6$ cell/ml)	۱/۸۸±۰/۳۵ [a]	۱/۶۷±۰/۰۸ [a]	۱/۷۳±۰/۳۸ [a]	۱/۴۶±۰/۱۹ [a]
گلبولهای سفید($\times 10^3$ cell/ml)	۱۳/۲±۳/۱۴ [ab]	۱۳/۲۶±۴/۰۸ [ab]	۱۷/۴±۲/۸۳ [a]	۹/۷۳±۱/۰۰ [b]
هماتوکریت(٪)	۲۹±۳۰ [a]	۳۲/۱۶±۱/۶۰ [a]	۳۰/۶۶±۱/۵۲ [a]	۳۲/۴۳±۱/۶۹ [a]
هموگلوبین(g/dL)	۵/۸۷±۱/۲۳ [b]	۷/۵۵±۰/۴۷ [ab]	۷/۱۲±۱/۰۵ [ab]	۸/۱۵±۰/۳۷ [a]
متوسط حجم گلبول قرمز(فمتولیتر)	۱۵۷/۳۵±۳۴/۲۳ [b]	۱۹۲/۶۷±۶/۳۹ [ab]	۱۸۱/۸۶±۳۳/۵۷ [ab]	۲۲۳/۶۳±۲۳/۷۷ [a]
متوسط هموگلوبین گلبول قرمز(پیکوگرم)	۳۱/۴۷±۶/۹۱ [c]	۴۵/۲۶±۲/۴۶ [b]	۴۱/۸۲±۶/۶۷ [bc]	۵۶/۲۱±۵/۳۱ [a]
متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (٪)	۲۰/۱۵±۲/۹۸ [a]	۲۳/۵۳±۲/۰۳ [a]	۲۳/۲۹±۳/۶۵ [a]	۲۵/۱۷±۱/۰۶ [a]

حروف متفاوت در یک ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<0/05$)

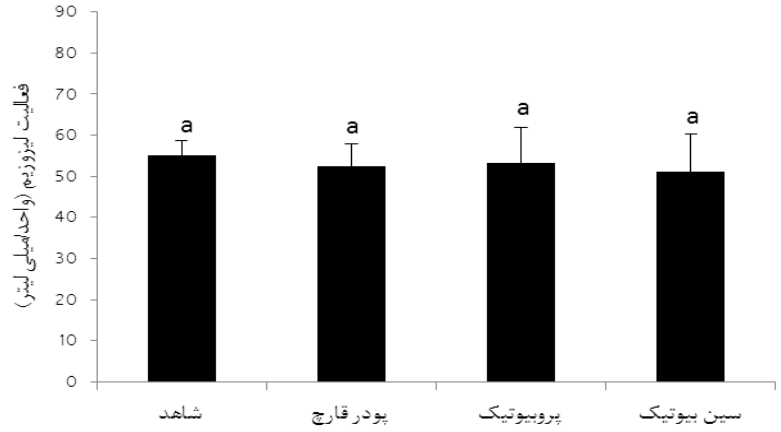
نتایج بدست آمده از بررسی استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک و پودر قارچ بر شاخص های ایمنی غیر اختصاصی شامل مقادیر ایمونوگلوبین سرم (Ig)، فعالیت لیزوزیم سرم و سیستم کمپلمان در جیره بچه ماهیان کپور به ترتیب در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که استفاده از سین‌بیوتیک مقادیر ایمونوگلوبین را افزایش داد. علی رغم افزایش محدود ایمونوگلوبین سرم (Ig) نسبت به تیمار شاهد، اختلاف آماری معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$). نتایج بررسی میزان فعالیت لیزوزیم نشان داد که کمترین میزان فعالیت در ماهیان تیمار سین بیوتیک مشاهده شد و بیشترین میزان فعالیت در گروه شاهد وجود داشت. با این حال اختلاف معنی داری بین هیچکدام از تیمارها ملاحظه نگردید ($p>0/05$). بررسی فعالیت سیستم کمپلمان در انتهای دوره نشان داد که کمترین میزان فعالیت در تیمار قارچ، و در گروه شاهد و سین بیوتیک تقریبا مشابه بود و به طور کلی اختلاف معنی داری نداشتند ($p>0/05$). بیشترین میزان فعالیت سیستم عامل کمپلمان در تیمار شاهد مشاهده گردید.



شکل ۱: میزان ایمونوگلوبولین کل سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۰/۹×۱۰^۷ CFU/g) و پودر *Agaricus bisporus* (۱۰ گرم بر کیلوگرم) ستون های مشخص شده با حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند ($p>0/05$)

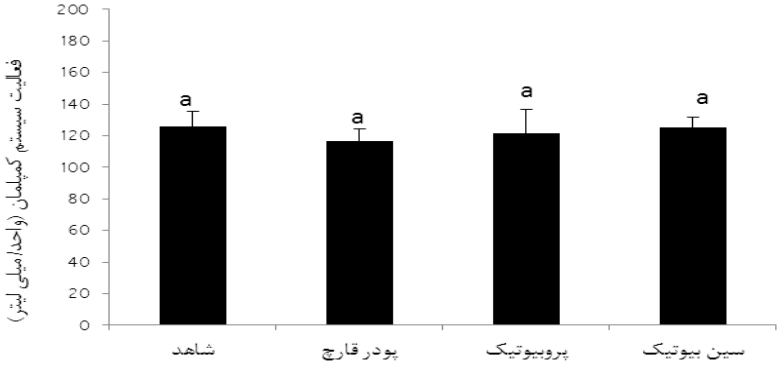
Figure 1: Total immunoglobulin levels of common carp fingerlings fed singular or combined administration of *Pediococcus acidilactici* and mushroom powder (*Agaricus bisporus*).The marked columns with the same letters indicate no significant difference ($p>0/05$).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]



شکل ۲: میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۰/۹×۱۰^۷ CFU/g) و پودر *Agaricus bisporus* (۱۰ گرم بر کیلوگرم)ستون های مشخص شده با حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند (p>۰/۰۵)

Figure 2: Lysozyme activity in the serum of common carp fingerlings fed singular or combined administration of *Pediococcus acidilactici* and mushroom powder (*Agaricus bisporus*). The marked columns with the same letters indicate no significant difference (p>0/05).



شکل ۳: میزان فعالیت سیستم کمپلمان سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۰/۹×۱۰^۷ CFU/g) و پودر *Agaricus bisporus* (۱۰ گرم بر کیلوگرم) ستون های مشخص شده با حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند (p>۰/۰۵)

Figure 3: Alternative haemolytic complement activity (ACH50) in the serum of common carp fingerlings fed singular or combined administration of *Pediococcus acidilactici* and mushroom powder (*Agaricus bisporus*).
The marked columns with the same letters indicate no significant difference (p>0/05).

بحث

مواردی همچون نوع گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و رژیم غذایی می توانند بر شاخص های خونی در ماهیان مؤثر باشند (Brunt & Austin, 2005; Osuigwe *et al*., 2005). با این حال اطلاعات کمی در زمینه اثرات مکمل های غذایی چون سین بیوتیک ها بر فاکتورهای خونی گزارش شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *P.acidilactici* و پودر قارچ به جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر تعداد گلبولهای قرمز، هماتوکریت و MCHC اثری ندارد. هر چند تیمار سین بیوتیک در اکثر شاخص‌های خونی عملکرد بهتری را نشان داد اما اختلاف آماری معنی داری از لحاظ تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و MCHC بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن مجزا و تلفیقی پروبیوتیک و پربیوتیک به جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از نظر میزان گلبول سفید، هموگلوبین، MCV و MCH موجب اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد شدند. نیازهای

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

اکسیژنی ماهیان بر اساس سن و شرایط محیطی تغییر می کند که این تغییر موجب تغییر تعداد گلبول های قرمز در هر میلی لیتر خون می گردد. نتایج مطالعه حاضر اختلاف آماری معنی داری را در تعداد گلبول های سفید نشان داد و بیشترین میانگین تعداد گلبول سفید در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پربیوتیک بود. تعداد گلبول های سفید علاوه بر اینکه یکی از شاخص های مهم سلامتی ماهی بود، همچنین نشان دهنده وجود یا عدم وجود عفونت، نوع واکنش بدن به عفونت و دیگر عوامل فیزیولوژیک و پاتولوژیک می باشند. در این بررسی عامل عفونت و استرس وجود نداشت. بنابراین افزایش تعداد گلبول های سفید در این مطالعه احتمالا در نتیجه استفاده از پربیوتیک در جیره به دلیل تحریک دستگاه ایمنی می‌باشد. با توجه به اینکه میزان هماتوکریت بیشتر در زمان استرس تغییر می کند (Iwama *et al.*, 1989) و در تحقیق حاضر عامل عفونت و استرس وجود نداشت، تغییری نیز در میزان هماتوکریت مشاهده نشد. واضح است که فاکتورهای خونی با توجه به عوامل محیطی از جمله دما، بیماری های عفونی، استرس، غذا، جنس و سن ماهی نیز تغییر خواهند کرد. هر اندازه ماهیان جوانتر باشند، نسبت به تغییرات محیطی حساس تر هستند (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۴).

در بررسی شاخص های خونی مشاهده شد که هموگلوبین، MCV و MCH در تیمار تغذیه شده با سین بیوتیک افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت. با این حال شیخ الاسلامی و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کردند که استفاده از پربیوتیک در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان اثری بر شاخص های مذبور نداشت. افزایش میزان هموگلوبین با توجه به نقش آن در انتقال اکسیژن به معنی بهبود شرایط زیستی، افزایش پتانسیل مقاومت زیستی و تحریک بهتر سیستم ایمنی است.

هم راستا با نتایج تحقیق حاضر در برخی از مطالعات پیشین تغییر در شاخص های خونی ماهی ها متعاقب استفاده از پروبیوتیک، پربیوتیک و یا سین بیوتیک در جیره غذایی گزارش شده است که این تفاوت ها احتمالا ناشی از تفاوت در نوع پروبیوتیک، پربیوتیک و سین بیوتیک مصرفی، سطح بکارگیری، ترکیب میکروبیوتای روده ای و یا نوع گونه ماهی می باشد (Soleimani *et al.*, 2012). در تحقیق دیگری شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در بچه ماهی کپور معمولی با استفاده از سطوح مختلف پودر قارچ مورد بررسی قرار گرفت و پارامترهای لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل موکوس نسبت به تیمار شاهد افزایش قابل توجهی از خود نشان داد که این تفاوت احتمالا ناشی از متفاوت بودن غلظت مکمل های غذایی مورد استفاده می‌باشد (Hoseinifar *et al.*, 2017). باکتری‌های بومی روده قادرند به طور گزینشی پربیوتیک‌ها را تخمیر کنند. تخمیر این سوبستراها در روده سبب افزایش انرژی و رشد باکتری‌های مفید روده‌ای می شود که این مورد به خودی خود اثرات مفیدی از طریق تقویت میکروبیوتای روده‌ای و ممانعت از تشکیل کلنی باکتری‌های بیماریزا دارد. این باکتری‌ها موادی ترشح می‌کنند که سبب تحریک دستگاه ایمنی شده و از این رو سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردند. اگرچه بررسی اثرات پربیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی در برخی مطالعات مورد توجه قرار گرفته است، اما اطلاعات محدودی در زمینه تعیین دقیق مکانیسم اثرگذاری پربیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی وجود دارد. همراستا با نتایج این تحقیق، در مطالعه صورت پذیرفته بر ماهی surubins نیز پس از استفاده از پروبیوتیک (*Weissella cibaria*)، پربیوتیک (اینولین) چه در حالت استفاده به صورت مجزا و یا توأم هیچ اثری بر میزان لیزوزیم مشاهده نشد (Mouriño *et al.*, 2012). همچنین استفاده از *B. subtilis* در ترکیب سین‌بیوتیکی با کیتوزان اثری بر فعالیت لیزوزیم سرم ماهی سوکلا نشان نداد و افزایش فعالیت لیزوزیم ارتباطی با حضور یا عدم حضور *B. subtilis* نداشت که حاکی از عدم متأثر شدن فعالیت لیزوزیم سرم از *B. subtilis* جیره است (Geng *et al.*, 2011). این مسئله احتمالاً ناشی از عدم کارایی مکمل‌های میکروبی بکار گرفته شده جهت افزایش شاخص های ایمنی است. با این حال در برخی از مطالعات پیشین در خصوص بکارگیری سین بیوتیک های مختلف در جیره غذایی ماهی نتایج متفاوتی گزارش شده است. بطور مثال در تحقیقی نشان دادند استفاده از ترکیب سین‌بیوتیک (فروکتو، مانان-الیگوساکارید و *B. clausii*) بطور معنی‌داری فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی فلاندر ژاپنی را افزایش می‌دهد که این افزایش بیشتر از حالتی بود که از پرو و پربیوتیک به طور مجزا استفاده شد (Ye *et al.*, 2011). همچنین با استفاده مجزا و تلفیقی از پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدیلاکتیکی و گالاکتوالیگوساکارید گزارش کردند که سین بیوتیک بطور معنی داری شاخص های ایمنی را افزایش داد. اختلاف در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

پیشین احتمالا ناشی از نوع سین بیوتیک مصرفی، سطح بکارگیری و نوع گونه ماهی می باشد (Hoseinifar *et al.*, 2017).

بطور کلی از یافته های مطالعه حاضر می توان چنین نتیجه گیری که استفاده مجزا و تلفیقی از *P. acidilactici* و پودر قارچ تغییراتی در برخی شاخص های خونی ایجاد نمود ولی اثر معنی‌داری بر شاخص های ایمنی سرم نداشت. این احتمال وجود دارد که میزان غلظتهای مورد استفاده کافی نبوده یا مدت زمان استفاده پرورش ماهیان برای اثر گذاری پروبیوتیک و پربیوتیک مناسب نبوده است. بنابراین جهت تعیین دقیق اثرات این مکمل ها بر ماهی کپور معمولی مطالعات بیشتری می بایست صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر علی جافرنوده، کارشناس محترم مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که در تمام مراحل انجام پژوهش حاضر همکاری و مساعدت کردند و طی اجرای کارهای عملی راهنمایی نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

جافرنوده، ع.، ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه، دانشگاه ارومیه.

جمیلی، ش.، ماشینچیان مرادی، ع.، بهمنی، م. و کیائی ضیابری، ک.، ۱۳۷۸. بررسی و شناخت فاکتورهای خونی اردک ماهی تالاب انزلی. اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران، لاهیجان.

حلاجیان، ع.، بهمنی، م.، کاظمی، ر.، دژندیان، س.، یوسفی جوردهی، ا. و خزایی، ا.، ۱۳۹۴. مطالعه برخی شاخص های ایمنی خون تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در آب های سواحل استان مازندران. مجله علمی شیلات ایران، ۲۴(۳): ۱۹۱-۲۰۲.

خانی، ف.، ایمانپور، م.، کلنگی میاندره، ح.، قائدی، ع. و تقی زاده، و.، ۱۳۹۴. اثر نوکلئوتید جیره بر پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون تاسماهی ایرانی جوان (*Acipenser persicus*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۴(۳): ۱۷۹-۱۹۰.

شیخ الاسلامی امیری، م.، ۱۳۸۷. تاثیر پربیوتیک اینولین بر رشد، بازماندگی، میکروفلور و سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. and Watanabe, T., 2000. Effects of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Science, 66(6): 1068-1075. DOI: 10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x.

Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C. and Ellis, A.E., 1999. *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. Infection and Immunity, 67(1): 294-301.

Brunt, J. and Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 28(12): 693-701. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00672.x.

Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcàzar, J.L. and Davies, S.J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Microbiology, 109(3): 851-862. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04713.x.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K., 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry, 37(4): 833-842. DOI: 10.1007/s10695-011-9481-4·

Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180(1): 147-165. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00187-8.

Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. and Liu, X.Q., 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish & Shellfish Immunology, 31(3): 400-406. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.06.006.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A. and Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews, 17(2): 259-275. DOI: 10.1079/NRR200479.

Herre, J., Gordon, S. and Brown, G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of β-glucans by macrophages. Molecular Immunology, 40(12): 869-876. DOI: 0.1016/j.molimm.2003.10.007.

Hoseinifar, S.H., khodadadian Zou, H., Kolangi Miandare, H., Hienvan, D., Romano, N. and Dadar, M ., 2017. Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: Effects on skin mucosal immunity and growth performance. Fish & Shellfish Immunology, 67: 346-352. DOI:10.1016/j.fsi.2017.06.023.

Iwama, G.K., McGeer, J.C. and Pawluk, M.P., 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology, 67, 2065-2073. DOI: 10.1139/z89-294.

Kruger, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantitation. Methods in Molecular Biology, 32(1): 9-15. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:9.

Martinez-Alvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M. and Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. Journal of Experimental Biology, 205(23): 3699-3706.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. Aquaculture Nutrition, 16(5): 496-503. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x.

Mouriño, J.L.P., Do Nascimento Vieira, F., Jatobá, A.B., Da Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q. and Martins, M.L., 2012. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). Aquaculture Nutrition, 18(1): 73-80.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x.

Osuigwe, D.I., Obiekezie, A.I. and Onuoha, G.C., 2005. Some haematological changes in hybrid catfish (*Heterobranchus longifilis x Clarias gariepinus*) fed different dietary levels of raw and boiled jackbean (*Canavalia ensiformis*) seed meal. African Journal of Biotechnology, 4(9): 1017-1021. DOI: 10.5897/AJB2005.000-3199.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. and Aoki, T., 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. Developmental & Comparative Immunology, 31(4): 372-382. DOI: 10.1016/j.dci.2006.07.004.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172(1): 63-92. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00436-0.

Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M. and Abadi, Z.H., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish & Shellfish Immunology, 32(2): 316-321. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.11.023.

Subramanian, S., Ross, N.W. and MacKinnon, S.L., 2008. Comparison of the biochemical composition of normal epidermal mucus and extruded slime of hagfish (*Myxine glutinosa* L.). Fish & Shellfish Immunology, 25(5): 625-632. DOI:10.1016/j.fsi.2008.08.012.

Whaley, K. and North, J., 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. Complement*:* A Practical Approach, 1: 19-47.

Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D. and Sun, Y.Z., 2011. Single or combined effects of fructmannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture Nutrition, 17: 902-911. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]

Effects of singular and combined administration of *Pediococcus acidilactici* and *Agaricus bisporus* on some blood indices and non-specific immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*)

Sepehrfar D.[1]; Sarvi Moghanlou K.[1*]; Hoseinifar S.H.[2]; Kolangi Miandare H.[2]

[*] k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of natural resource, Urmia University, Urmia, Iran
2-Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of *Pediococcus acidilactici* and *Agaricus bisporus* administration on some blood and non-specific immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). The total number of 180 fish with average weight of 19.06±0.69 g was adapted to laboratory conditions for 2 weeks. Afterwards, they were divided into 12 fiberglass tanks with the density of 15 fish in a tank. The study was performed in a complete randomize design for 2 months using 4 dietary treatments including the commercial diet (control group), commercial diet supplemented with *P. acidilactici* ($0/9\times10^7$ CFU/g), commercial diet supplemented with mushroom powder (10 g/kg), and commercial diet supplemented with the combination of *P. acidilactici* ($0/9\times10^7$ CFU/g) and mushroom powder (10 g/kg). At the end of the study, the results indicated that there was no significant difference in the number of red blood cells (RBC) among various groups. The highest levels of hemoglobin (8/15±0/37)(g/dL), MCV, 223/63±23/77(fL), MCH, 56/21±5/31(pg) and the lowest amount of white blood cell count, 9/73±1/00 ($\times10^3$ cell/ml) were observed in the synbiotic group ($p<0.05$). Furthermore, hematocrit (32/43±1/69%) and MCHC (25/17±1/06 %) showed a slight increase in the synbiotic treatment compared to the control group ($p>0.05$). Significant differences in the total immunoglobulin, lysozyme activity and ACH50 were not found among various experimental groups ($p<0.05$). In conclusion, the commercial diet supplemented with the combination of the probiotic ($0/9\times10^7$ CFU/g) and prebiotic (10 g/kg) improved some blood parameters in common carp.

Keywords: Blood indices, Non-specific immunity, Common carp

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-10-08]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.5.15.0]