مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۴۷۳- ۴۶۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,4: 463-473, 2015

اثرات ترکیبی مخمر ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون فیل ماهیان جوان پرورشی (*Huso huso*)

احمد حسن پور فتاحی[1*] حجت الله جعفریان[1] علیرضا خسروی[2]
۱) گروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان- ایران
۲) گروه قارچ شناسی، مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۳ آبان ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی میکروبی جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها تعریف می‌شوند که می‌توانند شاخص‌های سلامتی میزبان را تحت تأثیر قرار دهند. **هدف:** این تحقیق اثرات ترکیبی مخمر ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر را بر پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون فیل ماهیان جوان مورد بررسی قرار داد. **روش کار:** این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار بر روی بچه فیل ماهیان پرورشی با میانگین وزنی (± خطای استاندارد) ۳۱/۸±۲/۸۱g انجام شد. بچه ماهیان به صورت تصادفی در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس با تراکم ۳۰ قطعه ماهی در هر تانک توزیع گشته و با جیره‌های غذایی حاوی (2×10^6 (Cells/g) در تیمار اول، (4×10^6 (Cells/g) در تیمار دوم، (6×10^6 (Cells/g) در تیمار سوم و جیره پایه بدون پروبیوتیک در گروه شاهد به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. **نتایج:** جیره غذایی مکمل سازی شده با غلظت (6×10^6 (Cells/g) در تیمار سوم، بطور معنی‌داری پارامترهای بیوشیمایی سرم خون را بهبود داد ($p<0/05$)، با این حال پارامترهای هماتولوژی در تیمارهای تحت تأثیر جیره‌های مکمل سازی شده با پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند ($p>0/05$). بررسی نتایج بدست آمده از فاکتورهای رشد نیز حاکی از بهبود این شاخص‌ها در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** یافته‌های این پژوهش نشان داد که بکارگیری ترکیبی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر در سطوح مورد مطالعه می‌تواند موجب بهبود عملکرد برخی از پارامترهای بیوشیمیایی نظیر فاکتورهای متابولیتی، ایمنی، آنزیم‌ها و الکترولیت‌های سرم خون فیل ماهیان جوان شود. براساس نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که غلظت بکار رفته در تیمار سوم به عنوان یک محرک ایمنی برای فیل ماهیان جوان پرورشی بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس نایجر، سرم خون، هماتولوژی، بچه فیل ماهی، ساکارومایسس سرویزیا

مقدمه

امروزه فعالیت‌های بی‌شماری نظیر پرورش آبزیان در جهت افزایش تولید مواد پروتئینی به منظور تأمین نیازهای جوامع بشری انجام می‌گیرد و ماهیان خاویاری یکی از با ارزش‌ترین ماهیان شیلاتی محسوب می‌گردند که سود حاصل از فروش گوشت و خاویار آنها تأثیر قابل توجهی بر اقتصاد کشور دارد، اما متأسفانه نسل این نوع ماهیان به دلیل آلودگی محیط آبی، از بین رفتن زیستگاه‌های تکثیر و صید بی‌رویه و غیراستاندارد در حال انقراض است (۱۳). امروزه در زمینه تکثیر و پرورش این ماهیان تحقیقات زیادی صورت گرفته است، اما متأسفانه در زمینه فیزیولوژی، بیماریها و تحقیقات در زمینه پاراکلینیکی، اطلاعات محدودی در مورد این گونه وجود دارد. یکی از شاخه‌های مهم پزشکی و دامپزشکی که نقش آن در تشخیص اختلالات و بیماریها دارای اهمیت فراوان می‌باشد خون شناسی است. چنانکه بررسی فاکتورهای خون شناسی و بیوشیمیایی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماریهای عفونی، خونی و مسمومیت‌های آبزیان ایفا کند (۴۴).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی در آبزی‌پروری دارای تبعاتی از جمله خطر مقاوم شدن پاتوژن‌ها به این داروها، باقی ماندن داروها در گوشت ماهیان مورد تغذیه انسان و نیز مسأله آلودگی‌های زیست محیطی بوده است (۱۷). لذا در سال‌های اخیر استفاده از مواد محرک سیستم ایمنی در پرورش ماهی، به منظور افزایش توان سیستم ایمنی و پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی و حفظ بدن در برابر بیماریها عمومیت یافته است (۳۸) و به نظر می‌رسد با بکارگیری مواد محرک سیستم ایمنی نظیر پروبیوتیک‌ها می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های درمانی قبلی مطرح گردد و بسیاری از مشکلات را مرتفع سازد (۳۲). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده‌ای هستند که بوسیله بهبود بخشیدن به تعادل میکروبی روده، تأثیرات سودمندی بر میزبان ایجاد می‌کنند (۱۹). تأثیرات سودمند میکروارگانیزم‌های پروبیوتیکی در دامپزشکی نظیر حیوانات اهلی مختلف به خوبی شناخته شده است (۴۶). مخمر ساکارومایسس سرویزیا (*Saccharomyces cerevisiae*) از فرآورده‌های طبیعی صنایع آبجوسازی می‌باشد که به‌عنوان مکمل غذایی برای جانوران مختلفی استفاده شده است (۲۸،۲۹). محققین مختلفی اثرات سودمند مخمر ساکارومایسس سرویزیا را بر گونه‌های مختلف ماهی و میگو گزارش کرده‌اند (۲۹). همچنین آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) یکی از عمده پروبیوتیک‌های مورد استفاده در پرورش موجودات خشکی‌زی از جمله جوجه‌های گوشتی است (۵۳). مطالعات متعدد نشان داد که مخمر

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴-۳۴۳۲۲۳۶۲ نمابر: ۰۴۴-۳۴۳۲۲۲۰۰ Email: a.hasanpourf@gmail.com

ساکارومایسس سرویزیا می‌تواند فاکتورهای خونی و پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون را تحت تأثیر قرار دهد و سبب افزایش ایمنی غیراختصاصی ماهی شود که جزء شاخص‌های سلامتی ماهی به حساب می‌آیند (۶،۱)، این عملکرد در مورد آسپرژیلوس نایجر نیز توسط Al-Kassie و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Saleh و همکاران در سال ۲۰۱۰ به اثبات رسیده است.

خون به عنوان یک بافت سیّال، یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ترکیبات آن دستخوش تغییرات می‌باشد. لذا بررسی چگونگی تغییرات آنها می‌تواند در شناسایی بیماریها، تعیین شرایط بهداشتی و سلامت آبزیان مفید باشد (۸)، این مهم با تعیین مقادیر پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی به عنوان مبنا و شاخصی برای مقایسه و قضاوت در تشخیص بیماریها مورد تأکید قرار گرفته است (۴۰). پارامترهای بیوشیمیایی موجود در سرم خون به عنوان شاخص با ارزشی برای نظارت بر سلامت آبزیان و پاسخ‌های فیزیولوژیک تغذیه می‌باشند (۱۶). با اندازه‌گیری هر کدام از الکترولیت‌ها و غیر الکترولیت‌های سرم خون ماهی، ارزیابی مناسبی از وضعیت کبد، کلیه‌ها، غدد فوق کلیوی، سیستم ایمنی و اندام‌های دیگر بدست می‌آوریم. Choudhury و همکاران در سال ۲۰۰۵ در نتایج تحقیقات خود بیان کردند که بکارگیری مخمر به عنوان محرک ایمنی، سبب افزایش و بهبود معنی‌دار شاخص‌های خونی ماهی روهو (*Lebeo rohita*) از جمله تعداد کل گلبول‌های سفید خون می‌گردد. همچنین Abdel-Tawwab و همکاران در سال ۲۰۰۸، در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیا، بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد و پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون را گزارش کردند. نتایج مطالعات Hoseinifar و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز حاکی از بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد و عدم اختلاف معنی‌داری پارامترهای هماتولوژی فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف ساکارومایسس سرویزیا در تیمارهای آزمایشی بود. علاوه بر این Vijayakumar و همکاران در سال ۲۰۰۹ بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد و ایمنی پست لاروهای میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی آسپرژیلوس نایجر را مشاهده کردند. با توجه به اینکه تحقیقات اندکی پیرامون تأثیر جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی فیل ماهیان جوان در شرایط پرورشی صورت گرفته است، لذا هدف مطالعه حاضر ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی گونه‌های قارچی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر، با تعیین مقادیر برخی از پارامترهای هماتولوژیک (گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین) و بیوشیمیایی سرم خون (الکترولیت و غیر الکترولیت‌های سرم، آنزیم‌های سرمی، فاکتورهای ایمنی و یون‌های سرم خون) فیل ماهیان جوان پرورشی بود.

مواد و روش کار

جداسازی قارچ‌های پروبیوتیکی: بدین منظور از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان (استان گلستان)، تعداد یک عدد مولد فیل ماهی وحشی با ظاهری سالم از بین گونه‌های صید شده از دریا به طور تصادفی انتخاب شد و سپس نمونه دستگاه گوارش فیل ماهی در کنار یخ و در شرایط استریل به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال یافت. در آزمایشگاه، پس از باز کردن روده با استفاده از اسکالپل از مخاط روده نمونه اخذ و در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی و بدون سیکلوهگزامید به روش خطی کشت داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۳۰°C نگه‌داری گردید. سپس با بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی کلنی‌های قارچی رشد کرده و مشاهده مستقیم میکروسکوپی و کیت تشخیص و شناسایی مخمر RapIDTM گونه‌های پروبیوتیکی مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۴).

تهیه سوسپانسیون قارچ‌های پروبیوتیکی: پس از جداسازی قارچ‌های پروبیوتیکی و انتقال به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه گنبد کاووس، روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar: SDA) حاوی کلرامفنیکل به صورت جداگانه کشت داده سپس به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰°C قرار گرفتند. پس از طی شدن مدت زمان انکوباسیون و رشد سلول‌های قارچی، از آنها به صورت جداگانه سوسپانسیون تهیه شد. بدین ترتیب که ابتدا در یک میکروتیوب یک میلی‌لیتری مقدار ۵۰۰µL بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered saline: PBS) با PH=۷/۲ استریل ریخته شد. سپس با آنس استریل مقدار کمی از کلنی‌های رشد یافته به PBS اضافه گردید. پس از مخلوط شدن هر کدام از قارچ‌ها در بافر، با استفاده از لام نئوبار (Neubar lam) تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری شمارش و از آنها سوسپانسیون سلولی با تراکم‌های ۲×۱۰^{۶}، ۴×۱۰^{۶} و ۶×۱۰^{۶} (Cells/mL) به صورت ترکیبی از هر دوگونه قارچ پروبیوتیکی با نسبت یکسان، به ترتیب برای تیمار اول، دوم و سوم تهیه شد (۶۱،۶۲).

پرورش: این مطالعه در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان به مدت ۸ هفته انجام شد. فیل ماهیان جوان از همین کارگاه تأمین و پس از سازگاری اولیه ۳۶۰ عدد بچه فیل ماهی در حوضچه‌های فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری با میانگین وزنی ۳۱/۸±۲/۸۱g و طولی ۱۹/۲۰±۰/۲۱Cm ذخیره سازی شدند. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار ذکر شده در فوق و یک تیمار شاهد هر کدام با ۳ تکرار (هر تکرار ۳۰ عدد بچه ماهی) صورت پذیرفت. سوسپانسیون‌های پروبیوتیکی آماده سازی شده در سطوح مختلف، مطابق روش مورد استفاده توسط Chang و Liu در سال ۲۰۰۲، روی غذا اسپری گردیدند. در طول دوره آزمایش فیل ماهیان روزانه به میزان ۵٪ وزن بدن در ۴ نوبت غذادهی شدند (۴۹). ماهیان در ابتدای دوره پرورش و طی دوره پرورش هر ۱۵

روز یکبار زیست‌سنجی شدند. با توجه به یکسان بودن شرایط در تمامی ونیروها و جریان دائم آب ورودی تفاوت چندانی بین واحدهای آزمایشی از نظر فاکتورهای کیفی آب در طول دوره پرورش نبود. میانگین (± خطای استاندارد) اکسیژن محلول بطور متوسط در طول دوره پرورش mg/L ۶/۱۱±۰/۰۳، دمای آب ۲۷/۸۴±۰/۱۶°C، PH آب ۸/۰۸±۰/۰۲ و شوری آب g/L ۱/۱۳±۰/۰۲ در نوسان بود.

نمونه‌گیری و خون‌گیری: نمونه‌گیری از فیل ماهیان جوان جهت آزمایش‌های خونی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری، تغذیه ماهیان قطع گردید و سپس با عصاره گل میخک به میزان ۳۰۰mg/L ماهیان را بیهوش کرده (۳۵) و ۳ عدد ماهی به ازای هر تکرار آزمایشی (در مجموع ۳۶ عدد ماهی) به ظاهر سالم به طور تصادفی انتخاب شدند (۲۰) و از ورید ساقه دمی آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد. از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده مقدار ۱cc برای جداسازی سرم در لوله‌های سرولوژی فاقد ماده ضد انعقاد و ۱cc برای سنجش شاخص‌های هماتولوژی در ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین تقسیم گردید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰°C با دور ۵۰۰۰rpm سرم جدا و با سمپلر در لوله‌های کوچک تخلیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند (۲۱).

روش‌های اندازه‌گیری: آزمایش‌های هماتولوژی روی خون حاوی ماده ضد انعقاد هپارین انجام گرفت. شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد کل گلبول‌های سفید (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و درصد هماتوکریت (HCt) با روش توصیه شده توسط Noga در سال ۲۰۱۰ و برای محاسبه اندیس‌های خونی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC)، از روابط ارائه شده توسط Lee و همکاران در سال ۱۹۹۸ استفاده شد. اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون، با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Eppendrof, EPOS) ساخت کشور آلمان، طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی انجام شد (۲۰). پروتئین تام به روش بیورت (Biuret)(۱۸)، میزان آلبومین به روش بروموکرزول گرین (Bromocresol green)(۴۷)، اندازه‌گیری کلسترول به روش کلسترول اکسیداز (Cholestrol Oxidase) و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز (Lipase/GPO-PAP)(۳)، تعیین مقادیر کورتیزول به روش RIA (Radio immuno assay) با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک گاما کانتر (مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند) و بکارگیری کیت هورمونی Immuno tech ساخت فرانسه و اندازه‌گیری گلوکز سرم خون از روش آنزیماتیک با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل RA-۱۰۰۰، شرکت Technicon، ساخت آمریکا) و بکارگیری کیت‌های من (Man، ساخت ایران) انجام شد (۶۰).

اندازه‌گیری الکترولیت‌های سرم شامل میزان کلیسم و منیزیم، بر طبق روش Kazemi و همکاران در سال ۲۰۰۶، غلظت سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (Jenway-PEP ساخت کشور انگلستان) اندازه‌گیری شد (۵۴). سنجش آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) به روش رنگ سنجی سینتیک و آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک سینتیک صورت پذیرفت (۱۱). برای اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی، در این آزمایش شامل C۳ و C۴ با روش ارائه شده توسط Labor در سال ۱۹۹۸ و IgM با روش تشریح شده توسط Zilva و همکاران در سال ۱۹۸۴ اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های مربوط به تغییرات پارامترهای رشد، هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون در تیمارهای مختلف جمع‌آوری شد و از طریق واریانس یک طرفه و براساس آزمون Duncan در سطح خطای ۵٪، با استفاده از نرم افزار SPSS، ۱۶/۰ مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

اثرات سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر بر برخی شاخص‌های رشد در ابتدا و انتهای دوره آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است. در ابتدای دوره اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر وزنی و طولی وجود نداشت (p>۰/۰۵). بررسی داده‌های بدست آمده در انتهای دوره نشان داد افزودن سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی به جیره غذایی بچه فیل ماهیان سبب افزایش وزن و طول آن‌ها شده و موجب ارتقاء نرخ رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی شده است (p<۰/۰۵). با بکارگیری قارچ‌های پروبیوتیکی ضریب تبدیل غذایی بطور قابل توجهی در تیمارهای آزمایشی کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد و کمترین آن معادل ۱/۴۲ برای تیمار آزمایشی سوم بدست آمد (p<۰/۰۵).

بررسی تأثیر سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی بر برخی شاخص‌های خونی نشان داد که بکارگیری قارچ‌های پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر در جیره غذایی فیل ماهیان تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای هماتولوژی نداشت (p>۰/۰۵) و فقط در غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC)، در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پروبیوتیک افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵).

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری غیرالکترولیت‌های سرم خون (فاکتورهای متابولیتی) در جدول ۳ نشان داده شده است. براساس مقادیر مندرج در جدول در میزان گلوکز، کلسترول و کورتیزول سرم خون کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵) و بیشترین مقدار این پارامترها در گروه شاهد بدست آمد. همچنین میزان پروتئین تام و آلبومین سرم خون، بیانگر افزایش معنی‌دار این پارامترها در تیمارهای آزمایشی بود. به‌طوری که در تیمار آزمایشی سوم که با بالاترین غلظت پروبیوتیکی تغذیه شده بودند بیشترین میزان پارامترهای ذکر شده بدست

جدول۱. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) شاخص‌های رشد فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

شاخص‌های رشد	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (g)	۳۱/۸±۲/۸۱	۳۱/۸±۲/۸۱	۳۱/۸±۲/۸۱	۳۱/۸±۲/۸۱
طول اولیه (Cm)	۱۹/۲۰±۰/۲۱	۱۹/۲۰±۰/۲۱	۱۹/۲۰±۰/۲۱	۱۹/۲۰±۰/۲۱
وزن نهایی (g)	۱۷۱/۵۹±۳/۵۹ c	۱۹۲/۱۱±۱/۸۶ b	۱۹۴/۲۲±۰/۶۶ b	۲۱۳/۲۵±۰/۸۴ a
طول نهایی (Cm)	۳۴/۹±۲/۴۱ c	۳۶/۲۱±۱/۶۲ b	۳۶/۲۴±۱/۴۹ b	۳۶/۹۲±۱/۴۸ a
نرخ رشد ویژه (SGR٪)	۲/۵۶±۰/۳۳ c	۲/۷۵±۰/۲۰ b	۲/۷۷±۰/۲۱ b	۲/۹۱±۰/۲۱ a
ضریب تبدیل غذایی (FCR٪)	۱/۸۲±۰/۰۵ a	۱/۵۶±۰/۰۲ b	۱/۵۸±۰/۰۲ b	۱/۴۲±۰/۰۲ c

جدول ۲. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) پارامترهای هماتولوژی فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

پارامترهای خونی	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
تعداد گلبول‌های قرمز ($RBC\ Mil\ ul^{-1}$)	۰/۸۹±۰/۰۰۵	۰/۸۹±۰/۰۰۸	۰/۹۲±۰/۱	۰/۹۲±۰/۱
تعداد گلبول‌های سفید (WBC ul)	۶۱۳۳/۳۳±۸۸/۱۹	۶۵۳۳/۳۳±۱۴۵/۲۹	۶۶۰۰/۰۰±۱۷۳/۲۰	۶۶۰۰/۰۰±۱۵۲/۷۵
هماتوکریت (HCt٪)	۲۱/۷۵±۰/۱۹	۲۱/۸۰±۰/۲۶	۲۲/۶۰±۰/۴۵	۲۲/۷۱±۰/۵۴
غلظت هموگلوبین ($Hb\ g\ dl^{-1}$)	۶/۹۰±۰/۰۵	۶/۹۳±۰/۰۸	۷/۲۰±۰/۱۵	۷/۲۳±۰/۱۷
حجم متوسط گلبولی (MCV Fl)	۲۴۳/۰۷±۰/۶	۲۴۳/۵۱±۰/۸	۲۴۴/۶۲±۱/۵۵	۲۴۴/۸۲±۰/۹۲
وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH pg)	۷۷/۲۶±۰/۱۹	۷۷/۳۰±۰/۲۴	۷۷/۹۰±۰/۵۳	۷۷/۹۹±۰/۳۶
غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC٪)	۳۱/۷۲±۰/۰۴ b	۳۱/۸۰±۰/۰۱ ab	۳۱/۸۴±۰/۰۱ a	۳۱/۸۶±۰/۰۳ a

جدول ۳. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) فاکتورهای متابولیتی سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

فاکتورهای متابولیتی	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
گلوکز ($mg\ dl^{-1}$)	۵۹/۳۳±۲/۶۰ a	۳۳/۰۱±۱/۱۵ b	۳۵/۰۱±۰/۰۵ b	۳۱/۶۶±۱/۶۶ b
کلسترول ($mg\ dl^{-1}$)	۷۴/۶۶±۳/۵۲ a	۶۳/۳۳±۳/۳۸ b	۶۹/۳۳±۰/۳۳ ab	۶۰/۶۶±۱/۴۵ b
تری گلیسرید ($mg\ dl^{-1}$)	۴۱۷/۰۱±۳/۲۱	۴۱۰/۶۷±۵/۷۸	۴۱۵/۶۷±۱/۴۵	۴۰۳/۰۱±۶/۶۵
پروتئین تام ($g\ dl^{-1}$)	۱/۴۳±۰/۰۳ c	۱/۸۶±۰/۱۲ ab	۱/۶۶±۰/۰۶ bc	۲/۰۳±۰/۰۸ a
آلبومین ($g\ dl^{-1}$)	۰/۷۶±۰/۰۲ b	۰/۹۷±۰/۰۲ a	۰/۸۱±۰/۰۱ b	۱/۰۶±۰/۰۷ a
کورتیزول ($ng\ dl^{-1}$)	۲۰۲/۶۷±۶/۳۸ a	۱۶۹/۳۳±۱۲/۵۷ b	۱۸۲/۶۷±۸/۳۷ ab	c۱۱۶/۰۰±۸/۰۲ c

آمد.

در نتایج پارامترهای یونی سرم خون مشاهده گردید که مقادیر سدیم، پتاسیم و کلسیم سرم خون در تیمار آزمایشی سوم نسبت به سایر تیمارها از افزایش معنی‌داری برخوردار بودند (p<۰/۰۵) (جدول ۴). همچنین بررسی نتایج شاخص‌های ایمنی خون نیز بیانگر افزایش معنی‌دار میزان کمپلمان ۳ و ایمونوگلوبولین M در تیمارهای آزمایشی بود (p<۰/۰۵) و بیشترین مقدار پارامترهای ایمنی در تیمار آزمایشی سوم مشاهده گردید (جدول ۵).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به آنزیم‌های سرم خون نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی بود (جدول ۶). در میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) کاهش معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (p<۰/۰۵) و کمترین مقدار این آنزیم‌ها در تیمار آزمایشی سوم بدست آمد. در حالی که میزان آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز سرم خون افزایش معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی را نشان دادند (p<۰/۰۵) و بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در تیمار تغذیه شده با بالاترین سطوح پروبیوتیک، مشاهده گردید.

بحث

نتایج حاصل از زیست سنجی فیل ماهیان نشان داد که مکمل پروبیوتیک قارچی در این تحقیق معیارهای رشد نظیر وزن و طول نهایی و نرخ رشد ویژه را در تیمارهای تحت تأثیر، به طور معنی‌داری افزایش داد. افزایش رشد در نتیجه استفاده از مخمر می‌تواند به دلیل تولید پلی آمین توسط مخمر (۳۷) و یا به دلیل بهبود هضم مواد مغذی جیره باشد (۵۸). همچنین ضریب تبدیل غذایی نشان از بهبود این معیار در تیمارهای تغذیه شده با قارچ‌های پروبیوتیکی بود. این بدان معنی است که استفاده از این پروبیوتیک‌ها به صورت ترکیبی، کاهش در مقدار غذای لازم جهت رشد حیوان را به دنبال داشته که می‌تواند منجر به کاهش در هزینه‌های پرورشی شود (۲۶). در تأیید نتایج این تحقیق، مطالعه Hoseinifar و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که افزودن سطوح مختلف ساکارومایسس سرویزیا به جیره بچه فیل ماهیان اثرات معنی‌داری بر پیراسنجه‌های رشد دارد و موجب بهبود معنی‌داری شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذایی گردید. نتایج

جدول ۴. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) پارامترهای یونی سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

پارامترهای یونی	سدیم ($mg\ dl^{-1}$)	پتاسیم ($mg\ dl^{-1}$)	کلسیم ($mg\ dl^{-1}$)	منیزیم ($U\ L^{-1}$)
شاهد	۱۱۸/۳۳±۰/۸۸ b	۳/۰۳±۱/۱۳ b	۱۲/۵۰±۰/۳۰ b	۱/۳۳±۰/۳۶
تیمار ۱	۱۱۹/۶۷±۲/۶۰ ab	۳/۲۰±۰/۱۰ b	۱۲/۷۰±۰/۱۱ b	۱/۷۸±۰/۰۱
تیمار ۲	۱۱۸/۶۷±۲/۱۸ b	۳/۱۰±۰/۰۵ b	۱۲/۶۶±۰/۲۳ b	۱/۵۴±۰/۰۳
تیمار ۳	۱۲۵/۳۳±۱/۴۵ a	۳/۵۳±۰/۰۸ a	۱۴/۶۶±۰/۳۲ a	۱/۸۵±۰/۰۳

جدول ۵. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) پارامترهای ایمنی سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

پارامترهای ایمنی	کمپلمان ۳ ($C_3\ mg\ dl^{-1}$)	کمپلمان ۴ ($C_4\ mg\ dl^{-1}$)	ایمونوگلوبولین M ($IgM\ g\ dl^{-1}$)
شاهد	۰/۲۷±۰/۰۵ b	۰/۰۷±۰/۰۲	۰/۲۴±۰/۰۳ d
تیمار ۱	۰/۲۸±۰/۰۲ a	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۱ b
تیمار ۲	۰/۲۸±۰/۰۶ a	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۲۵±۰/۰۱ c
تیمار ۳	۰/۲۹±۰/۰۲ a	۰/۰۷±۰/۰۱	۰/۲۸±۰/۰۱ a

جدول ۶. مقایسه میانگین (Mean ± S.E.) آنزیم‌های سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی. حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

آنزیم‌های سرم	آسپارتات آمینوترانسفراز ($AST\ IU\ L^{-1}$)	آلانین آمینوترانسفراز ($ALT\ IU\ L^{-1}$)	آلکالین فسفاتاز ($ALP\ IU\ L^{-1}$)	آمیلاز ($Amylase\ U\ L^{-1}$)	لیپاز ($Lipase\ U\ L^{-1}$)
شاهد	۴۱۸/۰۱±۱/۷۳	۷/۶۶±۰/۳۳ a	۸۷۲/۳۳±۱۰/۶۸ a	۱۲۲/۰۱±۱/۰۴ c	۳۷/۲۳±۱/۴۰ b
تیمار ۱	۴۰۳/۶۷±۸/۸۳	۵/۶۶±۰/۶۶ b	۷۶۳/۳۳±۱۹/۲۲ c	۱۳۳/۷۳±۰/۷۸ b	۴۴/۶۶±۱/۸۷ b
تیمار ۲	۴۰۶/۰۱±۴/۱۶	۶/۰۰±۰/۵۷ b	۸۲۱/۶۷±۷/۴۲ b	۱۳۳/۰۳±۱/۰۷ b	۴۰/۹۶±۱/۷۵ b
تیمار ۳	۳۸۹/۳۳±۱۶/۱۸	۵/۳۳±۰/۳۳ b	۷۰۵/۶۷±۱۹/۶۷ d	۱۴۳/۹۳±۰/۹۲ a	۶۸/۴۰±۳/۳۳ a

مشابهی را Vijayakumar و همکاران در سال ۲۰۰۹، در پست لاروهای میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) تغذیه شده با جیره غذایی حاوی آسپرژیلوس نایجر مشاهده کردند.

شاخص‌های خونی در ماهیان می‌تواند متأثر از مواردی چون نوع گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و رژیم غذایی باشد (۱۲). با این حال اطلاعات محدودی در زمینه اثرات مکمل‌های غذایی چون پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای خونی ماهیان از جمله ماهیان خاویاری وجود دارد (۳۱). نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح مختلف قارچ‌های پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر تأثیر معنی‌داری بر تعداد کل گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و اندیس‌های خونی MCV و MCH نداشت، هر چند که بهبود نسبی در بین تیمارهای آزمایشی نمایان بود. نوع پروبیوتیک، غلظت محرک مورد استفاده و روش‌های مدیریت در پرورش ماهی، فاکتورهای اساسی می‌باشند که پاسخ‌های ایمنی ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵۷). نتایج مشابهی در مطالعه اثرات پروبیوتیکی مخمر ساکارومایسس سرویزیا بر تعداد کل گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، حجم متوسط گلبول قرمز و وزن هموگلوبین داخل گلبولی فیل ماهیان (*Huso huso*) بدست آمد (۲۰). همچنین Reque و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که مکمل ساکارومایسس سرویزیا بر فاکتورهای هماتولوژی گربه ماهی کانالی (Ictalurus punctatus) اثر معنی‌داری نداشت.

بسیاری از فعالیت‌های آبزی پروری سبب ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیک استرس در ماهی می‌شوند و مکانیسم اثر مواد مغذی و مکمل‌های غذایی بر غلظت کورتیزول سرم خون و در پی آن گلوکز خون تأثیر دارد و دارای الگوی مشخص و منظمی نیست (۲۷). گلوکز یکی از مهم‌ترین پارامترهای فیزیولوژیکی بوده که به عنوان شاخصی از پاسخ به استرس در ماهیان مطرح می‌باشد و افزایش در میزان گلوکز خون می‌تواند نشانه‌ای از استرس و یا آلودگی‌های محیطی باشد (۳۰). همچنین کورتیزول از مهمترین عوامل هورمونی مؤثر در ارزیابی پاسخ فیزیولوژیک ماهیان نسبت به تغییرات شرایط محیطی و استرس محسوب می‌شود و افزایش آن در راستای ایجاد سازگاری با شرایط تنش‌زا در ماهیان به اثبات رسیده است (۳۳). افزایش گلوکز در راستای تأمین انرژی انجام فرایندهای فیزیولوژیک در بدن ماهیان و تغییر میزان آن می‌تواند منعکس کننده اثرات کاتابولیک کورتیزول باشد و در واقع افزایش کورتیزول همواره با افزایش گلوکز همراه است (۷). در تحقیق حاضر میزان گلوکز و کورتیزول در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند، به طوری که در تیمار آزمایشی سوم میزان گلوکز و کورتیزول کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده شد. کاهش این دو پارامتر می‌تواند بیانگر کاهش استرس پروش ماهیان در تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر پروبیوتیک باشد. کلسترول بخشی از ساختار دیواره سلول‌ها را تشکیل می‌دهد و همچنین

یک پیش‌ساز برای صفرا و هورمون‌های استروئیدی محسوب می‌گردد (۲). میزان کلسترول سرم خون بیشتر تحت تأثیر درجه حرارات، شاخص گنادوسوماتیک، نرخ متابولیک و فعالیت تغذیه‌ای می‌باشد (۵۰). در این مطالعه میزان کلسترول سرم خون کاهش معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد نشان داد. در مقابل یافته‌های ما، Hoseinifar و همکاران در سال ۲۰۱۱ عدم تأثیر معنی‌دار مخمر ساکارومایسس سرویزیا بر میزان گلوکز و کلسترول سرم خون فیل ماهیان جوان را گزارش کردند. همچنین نتایج تحقیقات Abdel-Tawwab و همکاران درسال ۲۰۰۸ حاکی از افزایش معنی‌دار گلوکز و کلسترول سرم خون تیلاپیای نیل تغذیه شده با مخمر بود. این اختلاف می‌تواند ناشی از عوامل مختلف از جمله شرایط آزمایش، گونه ماهی، نوع و سطوح مختلف پروبیوتیک در این آزمایش با پروبیوتیک‌های بکار رفته در آزمایش محققین ذکر شده باشد.

غلظت کل پروتئین در پلاسما به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی ارگانیسم‌های آبزی به کار برده می‌شود (۴۲). در مطالعه حاضر میزان پروتئین و آلبومین سرم خون با افزایش سطوح پروبیوتیک در تیمارهای آزمایشی افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. همسوی با نتایج این تحقیق Abdel-Tawwab و همکاران درسال ۲۰۰۸، در تیلاپیای تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیا نشان دادند که این جیره سبب افزایش معنی‌دار سطح پروتئین کل تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد شده است. افزایش در میزان پروتئین تام سرم و غلظت آلبومین سرم می‌تواند به دلیل پاسخ‌های غیر اختصاصی قوی ماهی باشد (۵). در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار میزان یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم در تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر پروبیوتیک مشاهده گردید. همسوی با یافته‌های این تحقیق، نتایج ارائه شده توسط Taati و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید به عنوان محرک ایمنی و رشد، دارای اثرات قابل توجهی در افزایش اسمولاریته و Ca^{2+}، K^{+}، Na^{+} و Mg^{2+} در سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با این پری‌بیوتیک می‌باشد.

افزایش ایمنی به عنوان یک استراتژی مهم در آبزی پروری مطرح می‌باشد. کمپلمان‌ها، یکی از فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی هستند که تأثیر بسزایی در پاسخ ایمنی ماهی دارند. افزایش فعالیت کمپلمان به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی به کرات گزارش شده است (۵۱). تغییرات کمپلمان سرم درحفاظت از سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان بسیار مهم می‌باشد و بالا بودن سطوح C۳ و C۴ پلاسما در سلامتی ماهیان مؤثراست (۵۹). در تحقیق حاضر بهبود معنی‌دار میزان C۳ و IgM سرم خون ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد مشاهده شد که با نتایج Taati و همکاران در سال ۲۰۱۱ هم خوانی دارد. آنها گزارش کردند که سطوح IgM سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با تیمار حاوی ۱٪ پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید، به طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان گروه شاهد بود. همچنین در مطالعه Amiri و همکاران در سال ۲۰۱۱، میزان IgM سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پری‌بیوتیک اینولین به طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان گروه شاهد گزارش شد. لازم به ذکر است که مطالعات ایمنی شناسی در مورد ماهیان خاویاری محدود می‌باشد و بیشتر مطالعات در مورد کپور ماهیان و آزاد ماهیان صورت گرفته است (۲۳).

آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در بافت‌های مختلفی نظیر کبد (۴۸)، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی (۳۶)، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهی‌ها (۱۰) یافت می‌شوند. همچنین آلکالین فسفاتاز (ALP)، آنزیمی است که در اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و در مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود. این آنزیم‌ها غالباً در داخل میتوکندری سلول‌ها به ویژه در سلول‌های کبدی قرار دارند. لذا هر گونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن‌ها در پلاسما می‌گردد (۹). همچنین این آنزیم‌ها جزء آنزیم‌های با اهمیت در بررسی وضعیت سلامتی ماهیان هستند (۳۹)، لذا کاهش سطح فعالیت این آنزیم در پلاسمای ماهیان تحت تأثیر پروبیوتیک در این مطالعه می‌تواند حاکی از سلامتی بافت‌های فیل ماهیان به ویژه بافت کبد باشد. در تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری در میزان ترشح آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز مشاهده شد. همچنین در میزان آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز کاهش نسبی دیده شد که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. کاهش در میزان آنزیم‌های ذکر شده می‌تواند دلیلی بر عملکرد مناسب کبد و شرایط مناسب تغذیه‌ای باشد (۳). در مغایرت با نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات Akrami و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیانگر افزایش سطح آنزیم‌های سرم خون فیل ماهیان جوان پرورشی تغذیه شده با پری‌بیوتیک اینولین بود که این امر می‌تواند ناشی از تأثیر نامطلوب سطوح بکار رفته پری‌بیوتیک اینولین در جیره غذایی باشد. در مطالعه حاضر قارچ‌های پروبیوتیکی سبب افزایش معنی‌داری میزان آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز سرم خون فیل ماهیان شدند که این افزایش می‌تواند نشانگر بهبود قابلیت هضم در فیل ماهیان جوان باشد (۳). همسوی با این نتایج، در مطالعه‌ای افزودن پروبیوتیک مخمری دباریومایسس هانسنی HFI به جیره لاروهای ۲۷ روزه ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، موجب افزایش معنی‌دار ترشح آمیلاز شده است (۵۵). نتایج مشابهی نیز در افزایش ترشح آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز، در نتیجه افزایش رشد میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) تغذیه شده با باکتری‌های باسیلوسی گزارش شده است (۶۳). در مجموع نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که استفاده از ترکیب قارچ‌های پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیا و آسپرژیلوس نایجر در سطوح مورد مطالعه قابلیت تأثیر گذاری بالایی بر بهبود برخی از فاکتورهای رشد و پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون فیل ماهیان جوان پرورشی را دارند و این

پروبیوتیک‌ها می‌توانند به صورت ترکیبی با غلظت مورد اســتفاده در تیمار سوم، مکمل مناسبی برای جیره غذایی فیل ماهیان جوان پرورشی باشند. همچنین به‌منظور حصول اطمینان از تأثیر قارچ پروبیوتیکی آسپرژیلوس نایجر پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در این خصوص صورت پذیرد تا بتوان با قطعیت بیشتری در مورد پتانسیل پروبیوتیکی آسپرژیلوس نایجر در فیل ماهی و سایر آبزیان اظهار نظر کرد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین برخود لازم می‌دانند که از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، آقای مهندس بَلال، دکتر واحدی و دکتر شــریف زاده به خاطر مساعدت در اجرای طرح سپاسگزاری نمایند. همچنین از پرســنل محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان، آقایان مهندس مخدومی و قمصری، به جهت فراهم آوردن تســهیلات لازم و کلیه عزیزانی که در مســیر انجــام این پروژه از مساعدت آن‌ها برخوردار بودیم تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Budras, K.D., McCarthy, L., Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael, N.E.M. (2008) Evaluation of commercial live bakers yeast, Saccharomyces cerevisiae as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with Aeromonas hydrophila. Aquaculture. 280: 185-189.
2. Abdollahi, M., Imanpoor, M.R. (2011) Blood Serum biochemical parameters of Caspiomyzon wagneri (Kessler, 1870), Iran J Biol. 24: 915-924.
3. Akrami, R., ghelichi, A., Ahmadifar, E. (2011) Effect of dietary prebiotic inulin on hematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*). J Vet Res. 66: 131-136.
4. Al-Kassie, G.A.M., Al-jumaa, Y.M F., Jameel, Y.J. (2008) Effect of probiotic (*Aspergillus niger*) and prebiotic (*Taraxacum officinale*) on blood picture and biochemical properties of broiler chickes. Int J Poult Sci. 7: 1182-1184.
5. Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. (2009) Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquacult Res. 41: 61-69.
6. Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., Kumar, S. (2010) Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haematoimmunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. Res Vet Sci. 91: 103-109.
7. Ataei mehr, B., Habibi, K., Safaeiyan, SH., Mirzay, N. (2011) Effect of garlic extract (*Allium sativum*) on serum cortisol and blood glucose orally rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Iran J Vet Med. 7: 29-33.
8. Ballarin, L., Dall'oro, M., Bertotto, D., Libertini, A., Francescon, A., Barbaro, A. (2004) Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 138: 45-51.
9. Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Rafiee, Gh.R. (2008) Biochemical characteristics of blood and histopathological study of experimental diazinon poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Iran J Nat Resour. 65: 119-133.
10. Bhattacharya, H., Xiao, Q., Lun, L. (2008) Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonious*): A biochemical and histopathological evaluation. Tissue Cell. 40: 243-249.
11. Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F. (2004) Hematologic and serum biochemical values for jundia´ (*Rhamdia quelen*). Fish Physiol Biochem. 30: 21-25.
12. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. (2007) The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Fish Dis. 30: 573-579.
13. Carmona, R., Domezain, A., Garcia-Gallego, M., Antonio Hernando, J., Rodriguez, F., Ruiz-Rejon M. (2009) Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series. Vol 29. Springer Publication, New

York, USA.
14. Chang, C.I.W., Liu, W.Y. (2002) Anevaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis incultured European eel, *Anguilla anguilla* L. J Fish Dis. 25: 311-315.
15. Choudhury, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Kumar, S., Dass, S.S., Mukherjee, S.C. (2005) Dietary yeast RNA supplementaion reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. Fish Shellfish Immun. 19: 281-91.
16. Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., Hulata, G. (2004) Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. Aquac Res. 35: 1434-1440.
17. Diab, A.S., El-Nagar, G.O., Abd-El-Hady, Y.M. (2002) Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic). and Biogen as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. Suez Canal Vet Med J. 13: 745-75.
18. Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T.J.R., Schaffer, R.A. (1981) Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and Validation. Clin Chem. 10: 42-50.
19. Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animal. J Appl Bacteriol. 66: 365-378.
20. Hoseinifar, H., Mirvaghefi, A., Merrifield. D.L. (2011) The effects of dietary inactive brewers yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). Aquaculture. 318: 90-94.
21. Jalali Hajiabadi, S.M.A., Sadeghi, A.A., Mahbobiye Sofiyani, N., Chamani, M., Riyazi, Gh. (2009) Effect of L-carnitine supplementation on growth and blood parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sci Technol Agric Nat Resour. 47: 105-115.
22. Kazemi, R., Bahmani, M., Hallajian, A., Pourkazemi, M., Dezhandian, S. (2006) Investigation of blood serum osmo- and ion-regulation of mature and reared juvenile *Acipenser persicus*. J Appl Ichthyol. 22: 188-192.
23. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Hassan, H.M.D. (2007) Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. J Fish Biol. 70: 1931-1938.
24. Khosravi, A. (2003) Medical Mycology, Publication of Jihad Organization, University of Tehran (2th ed.) Tehran, Iran.
25. Labor, T. (1998) In Clinical Laboratory Diagnistics, use and assessment of Clinical Laboratory Results, (1st ed.) Frankfurt, Germany.
26. Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzman-Méndez, B.E., Lopez-Madrid, W. (2003) Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyce scerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216: 193-201.
27. Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M. (1998) Wintrobe's Clinical Hematology (10st ed.) Lippincott Williams &Wilkins, New York, USA.
28. Li, P., Gatlin, D.M. (2003) Evaluation ofbrewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as afeed supplement for hybrid striped bass (*Moronechrysops × M. saxatilis*). Aquaculture. 219: 681- 692.
29. Li, P.,Gatlin, D.M. (2005) Evaluation of theprebiotic Grobiotic-A and brewer's yeast asdietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops × M. saxatilis*). Aquaculture. 248: 197-205.
30. Likongwe, J.S., Stecko, T.D., Stauffer, J.R., Carline, R.F. (1996) Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 146: 37-46.
31. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., 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. Aquac Nut. 16: 504-510.
32. Mohammadi Azaram, M., Abedian Kenari, A., Abtahi, B. (2004) Effect of Protexin probiotics on the growth and survival rate of larval Rain-

bow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Mar Sci Technol. 3: 69-77.

33. Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev Fish Biol Fish. 9: 211-268.
34. Noga, E.J. (2010) Fish Disease: Diagnosis and Treatment (2nd ed.) A Black Well Publishing Company. North Carolina, USA.
35. Peik Mousavi, M., Bahmani, M., Savari, A., Mohseni, M., Haghi, N. (2011) Consider of different levels of methionine amino acid on growth indices and whole body composition of Juveniles *Huso huso* (Bluga). Vet Res. 89: 12-19.
36. Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M. (1996) Cytosolic aspartate aminotransferase from greymullet (*Mugil auratus* Risso) red muscle: Isolation and properties. Int J Biochem Cell Biol. 28: 873-881.
37. Peulen, O., Deloyer, P., Dandrifosse, G. (2002) Maturation of intestinal digestive and immune systems by food polyamines. In: Biology of the Intestine in Growing Animals. Zabielski, R., Gregory, P.S., Westrom, B. (eds.). Elsevier, Amsterdam. The Netherland. p. 145-167.
38. Raa, J. (1996) The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev Fish Sci. 4: 229-288.
39. Racicot, J.G., Gaudet M., leray, C. (1975) Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with emphasis on their diagnostic use: study of CCl4 toxicity and a case of Aeromonas infection. J Fish Biol. 7:825-835.
40. Rehulka, J., Minarik, B., Rehulkova, E. (2004) Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. Aquacult Res. 35: 529-546.
41. Reque, V.R.De., Moraes, J.R.E., De Andrade Belo, M.A., De Moraes, F.R. (2010) Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed Diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. Aquaculture. 300: 37-42.
42. Riche, M. (2007) Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops× M. saxatilis*) at various salinities. Aquaculture. 264: 279-284.
43. Saleh, A.A., Eid, Y.Z., Ebeid, T.A., Amber, k., Badawi, N., Hayashi, K. (2010) Effect of Aspergillus niger on broilers performance. Egypt. Poult Sci. 30: 1017-1029.
44. Shahsavani, D., Mohri, M., Mazandarani, M. (2006) Determination of references Values of some blood serum nonelectrolytes of *Acipencer persicus*. Pajouhesh & Sazandegi. (In Persian). 71: 48-51.
45. Sheikholeslami Amiri, M., Yousefian, M., Yavari, W., Safari, R., Ghiyasi, M. (2011) Evaluation of inulin as prebiotic on Rainbow trout (*Onchorhynchus Mykiss*) (Walbaum 1972) immunity characteristics and resistance to *Streptococcus* sp infection. Iran J Biol. 24: 303-312.
46. Sissons, J.W. (1989) Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. A review. J Sci Food Agric. 49: 1-13.
47. Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A. (2010) Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Aquat Sci. 5: 191-199.
48. Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D. (2004) Toxicological effects of malachite green. Aquat Toxicol. 66: 319-329.
49. Sudagar, M., Imanpoor, M., Hoseinifar, S.H. (2004) Effect of optimum (Ascogen or Vannagen) growth stimulant supplementation on the growth and survival rate of grand beluga juvenile (*Huso huso*). Iran J Mar Sci. 3:33-38.
50. Svoboda, M., Kourh, J., Hamackova, J., Kalab, P., Savira, L., Svabodova, Z., Vykusova, B. (2001) Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca* L.) during pre and postspawning period. Acta Vet Brno. 70: 259-268.
51. Swain, P.S., Dash. P.K., Sahoo. P., Routray. S.K., Sahoo. S.D., Gupta. P.K., Meher. N. (2006) Nonspecific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish Shellfish Immunol. 22: 38-43.
52. Taati, R., Soltani, M., Bahmani, M., Zamini,

A.A. (2011) Growth performance, carcass composition immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Irani J Fish Sci. 10: 324-335.

53. Tannock, G.W. (2001) Molecular assessment of intestinal microflora. J Clin Nutr. 73: 410-414.
54. Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., Denicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. (2004) Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wikins, USA.
55. Tovar, D., Zombonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez, R., Lasel, R. (2002) Effects of live yeast incorporation in compound diet digestion enzymes activity in sea bass larvae. Aquaculture. 204: 113-123.
56. Vijayakumar, M., Hoseph, I., Paulraj, R. (2009) Efficancy of fremented product as fishmeal replacement in the diet of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. Indian J Fish. 56: 115-121.
57. Vollstad, D., Bogwald, J., Gaserod, O., RA. D. (2006) Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor*) fry. Fish Shellfish Immunol. 20: 548-561.
58. Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L., Quentel, C. (2006) Cross effects of the strain of dietary Saccharomyces cerevisiae and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* fry. Aquaculture. 258: 470-478.
59. Yano, T. (1992) Assays of hemolytic complement activity. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, S.J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (eds.). SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA. Vol 2. p. 131-141.
60. Yooneszadeh, M., Bahmani, M., Kazemi, R., Pourdehghani, M., Feizbaksh, H. (2009) The survey of seasonal changes of cortisol, Glucose and Ionic in Farmed female Stellate Sturgeon, Acipenser stellatus. J Fish. 4: 1-11.
61. Zhang, H., Chen, F., Wang. X., Yao. H.Y. (2006) Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. Food Res. 39: 833-9.
62. Zhang, X., Cao, F., Sun, Zh., Yu, W., Zhao, L., Wang, G., Wangd, T. (2012) Effect of feeding Aspergillus niger-fermented *Ginkgo biloba* leaves on growth, small intestinal structure and function of broiler chicks. Livest Sci. 147: 170-180.
63. Ziae nejad, S., Azari Takami, GH., Mirvaghefi, A.R., Habibi Rezaei, M. (2006) Application of *Bacillus* spp. bacteria as a probiotic for enhancement of growth and production parameters in indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) Ponds. Iran J Nat Resour. 58: 843-852.
64. Zilva, J.F., pannall, P.R., Maclagan, N.F. (1984) Clinical chemistry in diagnosis and treatment (4st ed.). Publ. Lioyd-Luke. Medical books Ltd. London, England.

The combined effects of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* on the haematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*)

Hasanpour Fattahi, A.[1*], Jafaryan, H.[1], Khosravi, A.R.[2]

[1]*Department of Fishery, Gonbad University, Golestan- Iran*
[2]*Mycology Research Center, Faculty of Veterinary, University of Tehran, Tehran- Iran*
(Received 2 August 2015, Accepted 26 September 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Probiotics, in form of microbial supplements, are known to be a suitable alternative for antibiotics and can affect the health indicators of host. **OBJECTIVES:** The present study was conducted to assess the combined effects of dietary autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* on haematological and serumbiochemicalparameters of beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles. **METHODS:** This study was based on a completely randomized design with 4 treatments and 3 replicates on beluga juveniles with average weight of (mean ±SE) 31.8±2.81g. Beluga Juveniles were divided randomly into 12 fiber glassy tanks with density of 30 fish per tank and were fed with diet contain dietary probiotic with density of 2×10^6 (Cells/g) for the first treatment, 4×10^6 (Cells/g) for the second treatment, 6×10^6 (Cells/g) for the third treatment and basal diet without probiotic for the control group for 8 weeks. **RESULTS:** Diet supplementing with concentration of 6×10^6 (Cells/g), significantly improved serum biochemical parameters ($p<0.05$), however hematological parameters were affected by supplemented diet with probiotics that showed no significant difference in comparison with the control group ($p>0.05$). Also results indicate that growth factors were improved in experimental treatments in comparison with the control group. **CONCLUSIONS:** The results showed that the use of combination of these species with studied concentrations can improve the performance of some biochemical parameters such metabolites factors, immune, enzymes and serum electrolytes of beluga-juveniles. It is recommended that the concentration of *A. niger* and *S. cerevisiae*, used for third treatment be used as an immune stimulator for beluga juveniles.

Keyword: *Aspergillus niger*, blood serum, haematology, *Huso huso*, *Saccharomyces cerevisiae*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean (±S.E.) of growth performance of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and *A.niger*. Means in the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 2. Mean (±S.E.) of haematological parameters of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and *A.niger*. Means in thesame row with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 3. Mean (±S.E.) ofmetabolite factors in theblood serum of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and A.niger. Means in the same row with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 4. Mean (±S.E.) of ionic parametersin the blood serum of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and *A.niger*. Means in the same column with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Mean (±S.E.) of immunity parameters in the blood serum of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and *A.niger*. Means in the same column with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 6. Mean (±S.E.) of blood serum enzymes of beluga juveniles fed differentdietary levels of *S. cerevisiae* and *A.niger*. Means in the same column with different letters are significantly different ($p<0.05$).

***Corresponding author's email: a.hasanpourf@gmail.com, Tel: 044-34322362, Fax: 044-34322200**